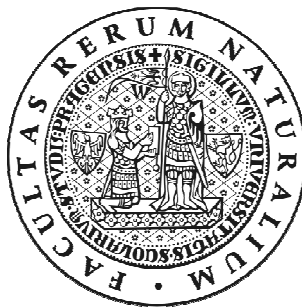


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lenka Jelínková

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ
GENOTOXICKÉHO 2-NITROFLUORENU
NA SÍTOTISKOVÝCH UHLÍKOVÝCH ELEKTRODÁCH

Voltammetric Determination of Genotoxic 2-Nitrofluorene at
Screen-Printed Carbon Electrodes

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857. Z tohoto výzkumného záměru byla také spolufinancována a dále finančně podpořena Univerzitou Karlovou v Praze (projekt UNCE 2012/44) a Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/G151).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14. května 2012

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za trpělivé odborné vedení, pomoc v mnoha ohledech a cenné připomínky k mé práci. Dále bych ráda vyjádřila dík prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a všem členům Katedry analytické chemie PřF UK Praha za všestrannou pomoc v mnoha ohledech a vytvoření kolegiální atmosféry.

V neposlední řadě si poděkování zaslouží i mí rodiče, kteří mi umožnili studium na vysoké škole.

Děkuji vám všem.

Abstrakt bakalářské práce

Voltametrické chování genotoxického 2-nitrofluorenu (NF) bylo zkoumáno pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) na sítotiskové uhlíkové elektrodě (SPCE). Byly nalezeny optimální podmínky pro jeho stanovení v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při použití techniky DCV a $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při použití techniky DPV. Optimálním prostředím pro DCV na SPCE byl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátový pufr o pH 4,6, optimální doba míchání vzorku před analýzou byla 120 s (dosažena mez stanovitelnosti (L_Q) byla $8,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NF). Pro DPV na SPCE byla optimálním prostředím kyselá složka Brittonova - Robinsonova pufru o pH 2,0; dosažené L_Q byly $6,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NF pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (doba míchání vzorku 120 s) a $2,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NF pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (doba míchání vzorku 300 s).

Abstract of the Bachelor Thesis

Voltammetric behavior of genotoxic 2-nitrofluorene (NF) has been investigated using direct current voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) at a screen-printed carbon electrode (SPCE). The optimum conditions have been found for its determination in a concentration range from 1×10^{-6} to $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ for DCV technique and from 1×10^{-7} to $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ for DPV technique. An optimum medium for DCV at the SPCE was a 0.1 mol l^{-1} acetate buffer of pH 4.6, an optimum time of stirring of the sample prior to the analysis was 120 s (the attained limit of quantification (L_Q) was $8.5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ of NF). For DPV at the SPCE, the optimum medium was an acidic component part of the Britton - Robinson buffer of pH 2.0; the attained L_Q s were $6.2 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ of NF for the concentration range from 1×10^{-6} to $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (at the stirring time of the sample of 120 s) and $2.0 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ of NF for the concentration range from 1×10^{-7} to $1 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (at the stirring time of the sample of 300 s).

Předmětová hesla:

analytická chemie
elektrochemie
voltametrie
nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky

Klíčová slova:

2-nitrofluoren
DC voltametrie
diferenční pulsní voltametrie
sítotisková uhlíková elektroda

Objective Words:

Analytical Chemistry
Electrochemistry
Voltammetry
Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Key Words:

2-Nitrofluorene
DC Voltammetry
Differential Pulse Voltammetry
Screen-Printed Carbon Electrode

Obsah

1. Úvod	7
1.1 Cíl práce.....	7
1.2 Studovaná látka	7
1.3 Výskyt, vlastnosti a biologické účinky 2-nitrofluorenu	8
1.3.1 Polyaromatické uhlovodíky (PAH)	8
1.3.2 Nitrované polyaromatické uhlovodíky (NPAH)	8
1.3.3 2-Nitrofluoren (NF)	11
1.4 Metody stanovení nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků.....	13
1.4.1 Předběžná separace a zakoncentrování.....	13
1.4.2 Spektrometrické metody.....	14
1.4.3 Chromatografické metody	14
1.4.4 Polarografické a voltametrické metody	15
1.4.5 Sítotisková uhlíková elektroda – pracovní elektroda	16
2. Experimentální část.....	19
2.1 Reagencie.....	19
2.2 Aparatura	19
2.3 Pracovní postupy	20
2.3.1 Předúprava pracovní elektrody	20
2.3.2 Voltametrická měření	20
2.3.3 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat	21
2.3.4 Stabilita zásobního roztoku 2-nitrofluorenu	22
3. Voltametrické stanovení 2-nitrofluorenu na SPCE.....	23
3.1 DC voltametrie	23
3.2 Diferenční pulsní voltametrie	32
4. Závěr	43
5. Literatura	44

Seznam použitých zkratek a symbolů

APAH	aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků
BR pufr	Brittonův - Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
C. A. S.	Chemical Abstract Service
DCV	DC voltametrie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
E	potenciál [mV]
E_p	potenciál píku látky [mV]
I	elektrický proud [nA]
I_p	elektrický proud píku látky [nA]
K_{OW}	rozdělovací koeficient n -oktanol/voda
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
L_Q	mez stanovitelnosti [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
M_r	relativní molekulová hmotnost
NF	2-nitrofluoren
NPAH	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
p-AgSA-CE	leštěná stříbrná pevná amalgamová kompozitní elektroda
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
R	korelační koeficient
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
SPCE	sítotisková uhlíková elektroda
SPE	sítotisková elektroda
t_m	čas míchání [s]
T_v	bod varu [$^{\circ}\text{C}$]
\tilde{x}	medián
\bar{x}	průměr
ZE	základní elektrolyt

1. Úvod

1.1 Cíl práce

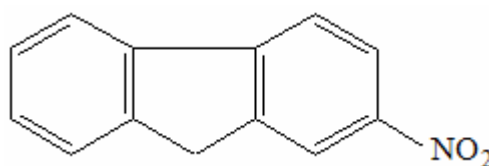
Tato bakalářská práce je součástí projektu řešeného na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, který se zabývá studiem elektrochemického chování biologicky aktivních (karcinogenních a genotoxických) organických sloučenin významných především z hlediska ochrany životního prostředí, ale také z hlediska klinického, farmaceutického a toxikologického.

Cílem této práce je nalezení optimálních podmínek pro voltametrické stanovení genotoxického 2-nitrofluorenu (NF) pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) na sítotiskové uhlíkové elektrodě (SPCE) se záměrem dosáhnout co nejnižší meze stanovitelnosti (L_Q).

1.2 Studovaná látka

Studovaná látka:	2-nitrofluoren
C. A. S. Name:	9H-Fluorene, 2-nitro-
C. A. S. Registry Number:	607-57-8

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec:	$C_{13}H_9NO_2$
Molární hmotnost:	$M_r = 211,22$
Teplota varu:	$T_V = 157 - 158\text{ }^{\circ}\text{C}$
$\log K_{OW}$ (při 25 $^{\circ}\text{C}$) (cit. ¹):	3,37
Kategorie karcinogenů dle IARC:	2B (možný karcinogen pro člověka)
Zkratka:	NF

2-Nitrofluoren je za laboratorní teploty (25 $^{\circ}\text{C}$) a atmosférického tlaku (101 kPa) jemně krystalický světle žlutý prášek s lipofilním charakterem. Dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech, např. v acetonu, methanolu, dimethylsulfoxidu, ale ve vodě je rozpustný jen velmi omezeně^{2,3}.

1.3 Výskyt, vlastnosti a biologické účinky 2-nitrofluorenu

Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH), k nimž patří i 2-nitrofluoren (NF), jsou zkoumány již od roku 1977, kdy se prokázala souvislost jejich přítomnosti v životním prostředí se zvýšeným výskytem rakoviny⁴. NPAH doprovázejí své mateřské PAH.

1.3.1 Polyaromatické uhlovodíky (PAH)

Přirozená rovnováha mezi produkcí a degradací PAH byla narušena průmyslovou revolucí v 19. a 20. století. Zvýšení hodnot koncentrací je až z 90 % způsobeno nedokonalým spalováním tabáku, dřeva, uhlí, rašeliny, ropy, benzínu a nafty⁵. PAH mohou být emitovány do ovzduší také z chemické výroby a nebo z použití různých surovin a produktů na bázi dehtu nebo kreosotu. Přírodní zdroje přispívají ke kontaminaci prostředí ve srovnání s antropogenními zdroji jen minimálně. Zahrnují především lesní a stepní požáry, vulkanickou činnost a v nepatrné míře biosyntézu pozemní vegetací nebo mikrobiální syntézu. PAH jsou stále sloučeniny s významnými toxickými účinky (např. prokázaná karcinogenita). Ve stopových koncentracích je lze nalézt ve všech složkách životního prostředí.¹ Nejvýznamnějšími reakcemi PAH v plynné i pevné fázi atmosféry jsou fotochemické reakce⁶. Z atmosféry jsou odstraňovány suchým (prach) a mokřým (děšť, mlha, sníh) spadem. Dominantní cestou odbourávání atmosférických PAH je fotodegradace a fotolýza, která závisí na intenzitě slunečního záření, teplotě, relativní vlhkosti a na povaze částic včetně jejich složení¹.

1.3.2 Nitrované polyaromatické uhlovodíky (NPAH)

Vznik a zánik NPAH

Hlavním zdrojem NPAH je nedokonalé spalování fosilních paliv a atmosférické reakce, při kterých vznikají radikálově iniciovanými reakcemi mezi PAH a oxidy dusíku⁷ nebo kyselinou dusičnou (přítomné ve znečištěném ovzduší). Oxidy dusíku působí jako nitrční činidlo a kyselina dusičná jako katalyzátor (nízké pH)⁸. Mohou být také tvořeny fotochemickými reakcemi PAH nebo aminoderivátů PAH (APAH)⁷, při některých úpravách potravin (např. připálením tuku¹ nebo při grilování^{9,10}), heterogenní reakcí částic NPAH s ozonem, nebo jako metabolity bakteriální a plísňové degradace PAH a nebo NPAH⁴. Hlavní cestou odbourávání atmosférických NPAH je pravděpodobně fotolýza, která závisí na intenzitě slunečního záření¹.

Výskyt NPAH

NPAH se v ovzduší vyskytují ve formě par nebo sorbované na pevných částicích aerosolu v koncentracích o několik řádů menších než jejich mateřské PAH. O rozdělení mezi plynnou fází a tuhé částice rozhoduje druh mateřského PAH, typ emisního zdroje a meteorologické podmínky. O koncentracích jednotlivých NPAH rozhoduje denní a roční doba. Hladiny NPAH nabývají nejvyšších hodnot v zimním období, kdy ke zvýšení koncentrací přispívá použití pevných paliv k vytápění domácností. Celkově je množství NPAH vytvořených v atmosféře podstatně vyšší, než množství NPAH vzniklých přímo při spalovacích procesech¹.

NPAH se v životním prostředí nacházejí především v důsledku lidské činnosti. Byly prokázány v aerosolových částicích výfukových plynů dieselových (v menší míře i benzinových) motorů, ve spalínách ze stacionárních zdrojů⁶, v sazích, v kapalných produktech tepelného zpracování uhlí, v emisích vznikajících při spalování černého uhlí či plynu, v polétavých popílcích, v emisích spaloven a závodů na výrobu hliníku, v sedimentech, tonerech pro kopírky, cigaretovém kouři¹, v různých materiálech, jako např. produktech z uhlí, ropné břidlice, v syntetických palivech¹¹ a dokonce i v některých potravinách^{6,7}. Nitrované polycyklické a heterocyklické aromatické sloučeniny jsou složkami výbušnin, pesticidů, herbicidů, barviv, protinádorových léčiv¹² atd.

Vlastnosti NPAH

NPAH jsou polárnějšího charakteru než mateřské PAH a jsou i méně těkavé. Lze je charakterizovat jako semivolatilní lipofilní látky. S rostoucí molekulovou hmotností se zvyšuje jejich bod tání, bod varu, lipofilita (rozdělovací koeficient *n*-oktanol/voda - K_{OW} ; čím je vyšší, tím vyšší je schopnost kumulace látky v sedimentech či v tukové složce biotických matric včetně potravin), a naopak klesá rozpustnost ve vodě a tenze par¹.

Toxické působení NPAH

Mutagenita a karcinogenita NPAH byla poprvé popsána v roce 1977 a o rok později Jäger a Pitts zjistili, jak tyto látky vznikají⁴. Většina NPAH je přinejmenším genotoxická, přičemž některé mohou působit jako mutageny anebo karcinogeny¹². NPAH vykazují vyšší toxicitu než jejich mateřské PAH. Jsou potenciálně mutagenní a karcinogenní pro člověka při inhalaci, požití a kontaktu s pokožkou¹³.

Orientace nitroskupiny výrazně ovlivňuje metabolismus, mutagenitu, tvorbu DNA aduktů a karcinogenitu těchto sloučenin. Mutagenita a karcinogenita NPAH se také liší v rámci polohových isomerů. Genotoxicita NPAH závisí jak na struktuře mateřského PAH, tak i na počtu a poloze přítomných nitroskupin¹ (viz. tab. 1).

Tab. 1: Genotoxické vlastnosti vybraných NPAH¹

<i>Sloučenina</i>	<i>Mutagenita</i>	<i>Teratogenita</i>
1-Nitropyren	++	-/+
4-Nitropyren	++	+
1,3-Dinitropyren	+++	+
1-Nitronaftalen	-/+	-
2-Nitronaftalen	-/+	+
2-Nitrofluoren	+	+
3-Nitrofluoranthén	+++	+
6-Nitrobenzo[a]pyren	++	-/+
7-Nitrobenzo[a]antracen	-/+	-/+
6-Nitrochrysen	+	+++

– inaktivní, -/+ velmi slabá, + slabá, ++ střední, +++ silná

Metabolismus NPAH

Do organismu vstupují NPAH především dýchacími nebo trávicími cestami. Mohou však být snadno a rychle absorbovány i kůží. Podle druhu expozice se odlišuje metabolická cesta těchto látek.

Po vstupu do organismu inhalací jsou NPAH metabolizovány v plicích za tvorby potenciálně mutagenních hydroxylovaných NPAH. Tyto sloučeniny přecházejí spolu s nemetabolizovanými NPAH do krevního oběhu, prostřednictvím kterého se dostávají do jater. V játrech jsou zbylé nemetabolizované NPAH metabolizovány na hydroxy-NPAH a konjugovány s kyselinou glukuronovou. Glukuronové konjugáty jsou pak vylučovány, ale dostanou-li se tyto konjugáty do střev, mohou být střevní β -glukuronidázou rozštěpeny zpět na volné hydroxy-NPAH, které představují potenciální karcinogeny ve střevech.

Při průchodu NPAH trávicí soustavou je většina těchto kontaminantů metabolizována ve střevech a vyloučena do 48 hodin. Pouze velmi malá část dávky (asi 1,5%) je metabolizována v játrech a vyloučena močí.

Hlavní metabolickou cestou NPAH ve střevech je redukce enzymy střevní mikroflóry na příslušné APAH. Enzymy střevní mikroflóry vykazují značnou substrátovou specifitu. APAH jsou dále metabolizovány v játrech acetylací a následnou hydroxylací. Hydroxylované acetyl-APAH jsou vylučovány samostatně nebo v konjugované formě.

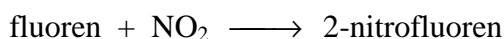
Druhou alternativní formou metabolismu NPAH trávicí soustavou je vznik hydroxylovaných NPAH. Ty jsou na rozdíl od hydroxylovaných acetyl-APAH silně mutagenní, dokonce více než samotné NPAH.

Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující metabolismus NPAH patří společný výskyt s PAH, které indukují systém cytochrom P-450, který pak metabolizuje nitroderiváty intenzivněji. Podobně působí i současně podaný alkohol. Také stav a složení střevní mikroflóry, poloha nitroskupiny na aromatickém jádře nebo přítomnost jiné funkční skupiny význačně ovlivňuje metabolismus NPAH¹.

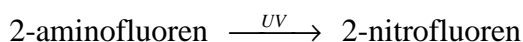
1.3.3 2-Nitrofluoren (NF)

Vznik NF

NF vzniká z mateřského uhlovodíku (= fluoren, PAH) elektrofilní nitrací¹⁴:



nebo se může vytvářet fotochemicky³:



Výskyt NF

NF se v životním prostředí nachází řádově v pg až ng v 1 m³ vzduchu, v závislosti na lokalitě a ročním období, kdy byl vzorek odebrán (viz. tab. 2).

Tab. 2: 2-Nitrofluoren v životním prostředí⁵

<i>Koncentrace</i>	<i>Město / země</i>	<i>Komentář</i>
24 - 71 pg·m ⁻³	Tokio a Kawasaki, Japonsko	tři vzorky z městského prostředí
50 - 700 pg·m ⁻³	Peking, Čína	38 vzorků, nejvyšší hodnoty v městských oblastech
310 - 5220 pg·m ⁻³	Berlín, Německo	24 vzorků, nejvyšší hodnoty během zimy a v topných oblastech
1,5 µg·kg ⁻¹	Řeka Suimon, Japonsko	říční sedimenty

NF je jeden z běžnějších NPAH nacházející se v prostředí spolu s 1-nitropyrenem⁶. Jeho poměrně vysoká mobilita způsobuje, že se nachází ve všech složkách životního prostředí. Byl zjištěn např. v sazích, v cigaretovém kouři, říčních sedimentech³ nebo v tonerech pro tiskárny¹⁵. V atmosféře se NF nachází ve dvou formách. Jako plynná složka nebo absorbovaný na pevných částicích aerosolu. Může dojít k přímé expozici vdechnutím NF přítomným v plynné fázi nebo absorbovaného na povrchu částic a k nepřímé expozici, dojde-li k usazení částic na zelenině či jiných produktech zemědělského původu určených k lidské spotřebě⁷.

Toxické vlastnosti NF

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) vyhodnotila údaje o NF a zařadila jej do skupiny 2B, což znamená, že je potenciálně karcinogenní pro člověka⁶. S určitostí je ale prokázáno, že je karcinogenní pro laboratorní zvířata a že meziprodukty jeho redukce interagují *in vitro* s DNA za vzniku DNA aduktů¹². Genotoxické vlastnosti NPAH obecně závisí jak na struktuře mateřské PAH, tak na počtu a umístění nitroskupin¹¹. Výčet zkoumaných genotoxických vlastností je uveden v tab. 3. NF nebyl testován na teratogenitu, přestože se tak některé jeho metabolity jeví³. Mnoha experimenty se prokázala role přítomnosti či nepřítomnosti střevní mikroflóry při vzniku DNA aduktů^{6,10,16}.

Tab. 3: Souhrn genotoxických efektů 2-nitrofluorenu⁵

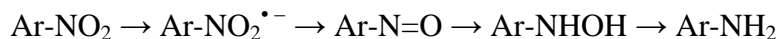
<i>Chemická analýza</i>	<i>Efekt</i>
Výměna sesterských chromatid	+
Chromosomové aberace	+
Iniciátor	+
Promoter	+
Karcinogenita	+
Vznik DNA aduktů	+
Mikrojaderné testy	–
Mutační testy, savčí buňky	+
Bakteriální mutagenita (<i>Salmonella</i>)	+
Bakteriální mutagenita (<i>Escherichia coli</i>)	+
Mutagenita, hlísticový test	+
Mutagenita, myši	+
Neplánované vyvolání syntézy DNA	+

+ pozitivní efekt, – negativní efekt

Metabolismus NF

Po přímé expozici vdechnutím je NF metabolizován v plicích, přičemž vzniká hydroxylovaný NF. Ten přechází s nepřeměněným NF do krevního oběhu, jímž putují obě xenobiotika do jater, kde je zbylý NF metabolizován na hydroxy-2-nitrofluoren a konjugován s kyselinou glukuronovou. Glukuronové konjugáty jsou vylučovány, ale dostanou-li se do střev, mohou být rozštěpeny β -glukuronidázou opět na volný hydroxy-2-nitrofluoren, který je potenciálním karcinogenem, jenž je více mutagenní než mateřský

NF⁷. Metabolismus po nepřímé expozici trávicím traktem probíhá podle dříve uvedeného schématu (viz. část *Metabolismus NPAH*). Buněčnou degradaci NPAH katalyzuje NADPH-cytochrom P-450 reduktáza podle následujícího schématu (Ar značí arylovou skupinu)¹¹:

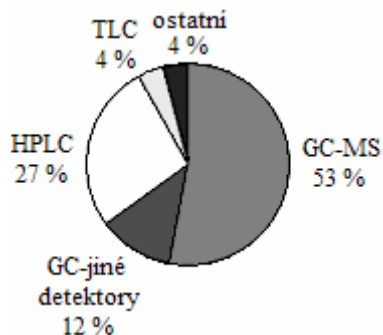


1.4 Metody stanovení nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků

Stanovení NPAH, které se ve všech matricích vyskytují v podstatně nižších koncentracích (a jsou také škodlivější) než PAH, je poměrně obtížné a výsledky jsou zpravidla spojeny se značnou nejistotou¹. Přesto byla pro stanovení NPAH popsána řada analytických metod (podrobnější přehled je uveden například v práci¹⁷).

Volba metody závisí nejen na matrici, ve které se látka vyskytuje a koncentraci, ve které je v dané matrici obsažena, ale je také třeba posuzovat požadavky na přesnost, citlivost, spolehlivost, rozlišovací schopnost, rychlost, možnost automatizace, problematiky typu vzorky, účel analýzy a mnohé další.

Srovnání některých běžně používaných analytických metod je zobrazeno na obr. 1.



Obr. 1: Relativní zastoupení chromatografických metod používaných ke stanovení NPAH (převzato z cit.¹)

1.4.1 Předběžná separace a zakoncentrování

Interferující látky koextrahované z komplexních matric spolu s NPAH zpravidla neumožňují jejich přímou, spolehlivou identifikaci (a především kvantifikaci) bez předběžného použití extrakčních a chromatografických technik.¹⁸ Těmi je možné docílit dostatečné selektivity analytických metod. Pro předběžnou separaci a prekoncentraci analytu z klinických, environmentálních či průmyslových matric, jako je např. pitná a říční voda či lidská moč, se nejlépe osvědčila předběžná frakcionace pomocí extrakce tuhou fází (SPE)¹⁹, kapalinové extrakce (LLE), chromatografie na tenké vrstvě (TLC), sloupcové chromatografie (CC) nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

1.4.2 Spektrometrické metody

Pro stanovení NF bez předchozího separačního kroku se využívá metoda stanovení pomocí UV-VIS spektrofotometrie. NPAH díky jejich aromatickému systému a přítomnosti nitroskupiny absorbují záření v ultrafialové i viditelné oblasti spektra.

Fluorimetrii, která je velmi dobře použitelná pro důkaz a stanovení PAH a APAH, nelze použít pro NPAH, protože nevykazují prakticky žádnou fluorescenci²⁰. Pro důkaz a stanovení NPAH můžeme využít jejich silnou fosforescenci při nízkých teplotách.

1.4.3 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou nejčastěji využívány ke stanovení NPAH v environmentálních i biologických vzorcích vzhledem k jejich mimořádné selektivě, citlivosti a vhodnosti pro sériové analýzy¹⁴. Tyto metody se ale vyznačují vysokými investičními a provozními náklady²¹.

V důsledku přítomnosti polární funkční skupiny (a také vyšší M_r) mají NPAH odlišné chromatografické vlastnosti, což se projevuje zejména při přečišťování extraktů reálných vzorků.

Ve spojení s chromatografickou separací se k těmto účelům nejčastěji používá plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (GC-MS). Při použití hmotnostního spektrometru (MS) je nutné ionizaci v iontovém zdroji převést neutrální molekuly analytu na ionty v plynné fázi. Nejvíce používanou technikou je elektronová ionizace (EI) a chemická ionizace (CI)²². Chemická ionizace minimalizuje analytickou interferenci sloučenin, které koeluuji s NPAH. Užití chemické ionizace při GC-MS-MS dovoluje kvantifikaci některých NPAH extrahovaných ze vzduchu bez předchozího čištění.

Méně častá je aplikace vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční (HPLC-FD) nebo chemiluminiscenční (HPLC-CHLD) detekcí, použitelná až po redukci NPAH na fluoreskující APAH, nebo kapilární elektroforéza (CE)²³ např. s UV/VIS absorpčním detektorem²⁴. Redukce NPAH se provádí on-line, např. pomocí Pt/Rh katalyzátoru na Al_2O_3 ; APAH jsou ale značně nestabilní¹.

HPLC umožňuje dosáhnout vyššího rozlišení a reprodukovatelnosti než klasická kapalinová chromatografie (LC)²⁰ a tenkovrstvá chromatografie (TLC). Velmi často se pro stanovení NPAH používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) na koloně C-18 s mobilní fází tvořenou methanolem a vodným roztokem pufru, případně lze místo methanolu použít acetonitril²⁵. V soustavě HPLC-ED-FD v ED probíhá

redukce nitro skupiny, zatím co FD slouží k detekci a kvantifikaci analytů¹⁴. HPLC-MS se hodí pro netěkavé, polární či tepelně nestabilní látky.

K detekci NPAH lze použít následující detektory: plamenový ionizační detektor (FID)^{26,27}, termoionizační dusíko-fosforový detektor (NPD)²⁸, hmotnostní detektor (MS)²⁹, UV detektor²⁵ nebo detektor elektronového záchytu (ECD), který byl za tímto účelem vyvinut. Zařazení ECD vyžaduje redukci sloučeniny na odpovídající APAH následovanou derivatizací, čímž se až desetkrát zvýší citlivost. Po redukci nitroskupiny přichází v úvahu fluorescenční detektor (FD)²⁰, elektrochemický detektor (ED)³⁰ nebo chemiluminiscenční detektor (CHLD)¹⁵.

1.4.4 Polarografické a voltametrické metody

Elektroanalytické metody představují užitečnou alternativu k častějším chromatografickým metodám. Pro stanovení NF bez předchozího separačního kroku se pro stopovou analýzu využívají moderní polarografické a voltametrické metody, které využívají snadnou elektrochemickou redukovatelnost nitroskupiny ($-\text{NO}_2$) na aromatickém jádře. Vzhledem k nízké polaritě NPAH lze využít adsorpční rozpouštěcí voltametrii (AdSV) pro stanovení koncentrací v rozmezí 10^{-7} - 10^{-10} mol·l⁻¹ (cit.^{31,32}), DC voltametrii (DCV), diferenční pulzní polarografii (DPP) nebo diferenční pulsní voltametrii (DPV)⁴.

Hlavními výhodami elektroanalytických metod jsou nízké pořizovací a provozní náklady, vysoká citlivost, přijatelná selektivita, snadná miniaturizovatelnost a automatizovatelnost a v neposlední řadě snadná přenosnost lehkých analytických přístrojů umožňující jejich použití v terénu při velkoplošném monitorování různých škodlivých organických látek³³. V tab. 4 jsou uvedena některá voltametrická a ampérometrická stanovení použitelná ke stanovení NF^{4,33}.

Tab. 4: Voltametrická a amperometrická stanovení 2-nitrofluorenu

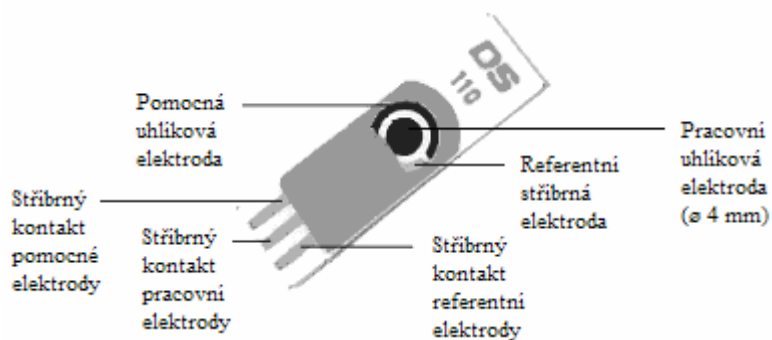
<i>Pracovní elektroda</i>	<i>Technika</i>	<i>Prostředí</i>	<i>L_Q [mol·l⁻¹]</i>
SMDE	DPP	BR pufr pH 12,0 - methanol (1:1)	4·10 ⁻⁷
	DCTP	BR pufr pH 12,0 - methanol (1:1)	4·10 ⁻⁶
HMDE	DPV	BR pufr pH 12,0 - methanol (9:1)	4·10 ⁻⁸
	AdSDPV	BR pufr pH 12,0 - methanol (9:1)	3·10 ⁻⁹
m-AgSAE	DPV	BR pufr pH 10,0 - methanol (1:1)	2·10 ⁻⁷
	DCV	BR pufr pH 10,0 - methanol (1:1)	2·10 ⁻⁶
	AdSDPV	1·10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹ LiOH - methanol (9:1)	2·10 ⁻⁹
p-AgSA-CE	DPV	BR pufr pH 5,0 - methanol (1:1)	3·10 ⁻⁶
	DCV	BR pufr pH 5,0 - methanol (1:1)	4·10 ⁻⁶
GCPE	DPV	BR pufr pH 7,0 - methanol (3:7)	8·10 ⁻⁶
	DCV	BR pufr pH 7,0 - methanol (3:7)	8·10 ⁻⁶
BDDFE	DPV	BR pufr pH 3,0 - methanol (1:1)	4·10 ⁻⁶
	DCV	BR pufr pH 8,0 - methanol (1:1)	2·10 ⁻⁶

AdSDPV - adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie; *BDDFE* - borem dopovaná diamantová filmová elektroda; *DPP* - diferenční pulzní polarografie; *DPV* - diferenční pulsní voltametrie; *DCTP* - DC tast polarografie; *DCV* - DC voltametrie; *BR pufr* - Brittonův - Robinsonův pufr; *GCPE* - uhlíková pastová elektroda ze skelného uhlíku; *HMDE* - visící rtuťová kapková elektroda; *m-AgSAE* - rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda; *p-AgSA-CE* - leštěná stříbrná pevná amalgámová kompozitní elektroda; *SMDE* - statická rtuťová kapková elektroda

1.4.5 Sítotisková uhlíková elektroda – pracovní elektroda

Tato bakalářská práce byla zaměřena na použití jednorázových sítotiskových uhlíkových elektrod (SPCE)³⁴ (obr. 2), které zatím nebyly testovány pro stanovení NPAH.

Přísné ekologické a bezpečnostní předpisy zaváděné jak ve světě, tak i v České republice, ale i řada obecně rozšířených předsudků a omylů, zakazují nebo podstatným způsobem komplikují používání elektrod obsahující kapalnou rtuť³⁵. Vzhledem k rostoucím obavám z toxicity kapalně rtuti, které během posledního desetiletí vyústily v tzv. „merkurofóbiu“⁴, se v posledních letech věnuje velká pozornost vývoji pevných nertuťových elektrod nebo elektrod neobsahujících kapalnou rtuť³⁶. V uplynulých pěti letech byla v UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí při Katedře analytické chemie PřF UK Praha věnována značná pozornost systematickému vývoji vysoce citlivých elektroanalytických metod pro stanovení NPAH pomocí nových typů pracovních elektrod¹⁹.



Obr. 2: Schéma sítotiskové uhlíkové elektrody DropSens, rozměry (d x š x v):
33 x 10 x 0,5 mm

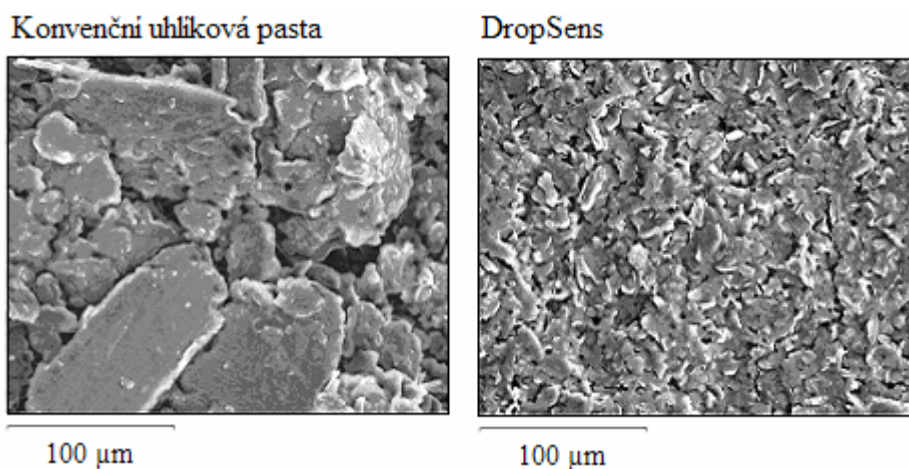
Přibližně od roku 1990 je sítotisková technologie, která byla převzata z oboru mikroelektroniky, nabízena jako velmi levná velkovýrobní technika. Senzory připravené pomocí této techniky vykazují vysokou reprodukovatelnost a spolehlivost, což znamená, že jsou vhodné pro *in situ* analýzy³⁷.

Nízké náklady na výrobu SPE umožňují její výrobu a produkci ve velkém při zachování dostatečné reprodukovatelnosti³⁸. Nejčastěji používané podklady v technologii sítotisku jsou podklady z keramických a plastových materiálů. Keramické materiály umožňují použití vyšší teploty vytvrzování inkoustů, což není možné u plastových podkladů³⁹.

Uhlíkový materiál má velmi čistou krystalickou strukturu, která zajišťuje nízké zbytkové proudy a vysoký odstup signálu od šumu. Uhlíkový inkoust používaný pro pracovní elektrody musí obsahovat pojivo, rozpouštědlo a vodivé grafitové částice³⁸. Grafitové materiály jsou upřednostňovány díky své jednoduché technické zpracovatelnosti a nízké ceně³⁷. Různé elektrodové materiály se používají pro různé potenciály. Grafit lze použít v rozmezí potenciálu od asi $-1,6$ V do $+1,1$ V. Grafitové elektrody často mají nízkou stabilitu a špatnou reprodukovatelnost. Chemická reakce na povrchu elektrody probíhá až do vzdálenosti 10 nm (cit.⁴⁰).

Existuje vztah mezi morfologií povrchu a elektrochemickou aktivitou elektrody. Proto by měl výběr elektrody záviset na konkrétní elektroanalytické aplikaci a použité technice³⁹. Velká flexibilita zmiňovaných SPE spočívá v široké škále způsobů, kterými mohou být elektrody upraveny. Složení tiskových barev může být změněno přidáním velmi odlišných látek, jako jsou kovy, enzymy, polymery, komplexotvorné látky apod. Na druhé straně také existuje možnost modifikace vyráběné elektrody pomocí ukládání různých látek na povrchu elektrod, jako jsou kovové fólie, polymery, enzymy atd.³⁷.

Vlastnosti elektrody bývají vylepšovány elektrochemickou aktivací nebo chemickou modifikací jejího povrchu před měřením³⁹. Na obr. 3 je vidět porovnání povrchu konvenční uhlíkové pastové elektrody a uhlíkové sítotiskové elektrody DropSens.



Obr. 3: Snímky neupravené uhlíkové pracovní elektrody zachycené rastrovacím elektronovým mikroskopem: (1) konvenční uhlíková pastová elektroda, (2) sítotisková elektroda DropSens (cit.³⁹).

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Studovaná látka: 2-nitrofluoren (98%, Sigma – Aldrich Laborchemikalien, Německo). Zásobní roztok NF (100 ml roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byl připraven rozpuštěním 0,02112 g této látky v methanolu za pomoci ultrazvuku (sonifikace po dobu 5 minut). Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním tohoto zásobního roztoku. Zásobní roztok byl uchováván ve tmě za laboratorní teploty.

Ostatní použité chemikálie (čistota p.a.): kyselina chlorovodíková (36%, Lachema Brno, ČR), hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR), chlorid draselný (Lachema Brno, ČR), hexakynoželesnatan draselný (Lachema Brno, ČR) a methanol (Penta, ČR).

Brittonovy-Robinsonovy pufrы (BR pufrы) o potřebném pH byly připravovány mísením $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku NaOH s roztokem obsahujícím $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselinu boritou (Lachema Brno, ČR), fosforečnou (85%, Lachema Brno, ČR) a octovou (99%, Lach-Ner, ČR). Pro přípravu všech vodných roztoků byla použita deionizovaná voda (Millipore, USA). Veškeré používané roztoky byly uchovávané ve skleněných nádobách.

Pro přípravu $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátového pufru o pH 4,6 byl použit trihydrát octanu sodného (Lach-Ner, Neratovice, p.a. čistota) a kyselina octová.

2.2 Aparatura

Při všech voltametrických měřeních byla používána sestava Eco-Tribo Polarograf a software PolarPro verze 5.1 (Polaro-Sensors, ČR). Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA).

Měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, jako pracovní elektroda byla použita SPCE (DRP-110, DropSens, Španělsko), jako referentní elektroda byla použita kalomelová elektroda ($c_{\text{KCl}} = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a jako pomocná byla použita platinová elektroda (typ PPE, Monokrystaly, Turnov, ČR). Při technice DPV byly na pracovní elektrodu vkládány pulsy o šířce 100 ms a výšce -50 mV . Rychlost nárůstu potenciálu (polarizace) činila $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Při technice DCV byla použita rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

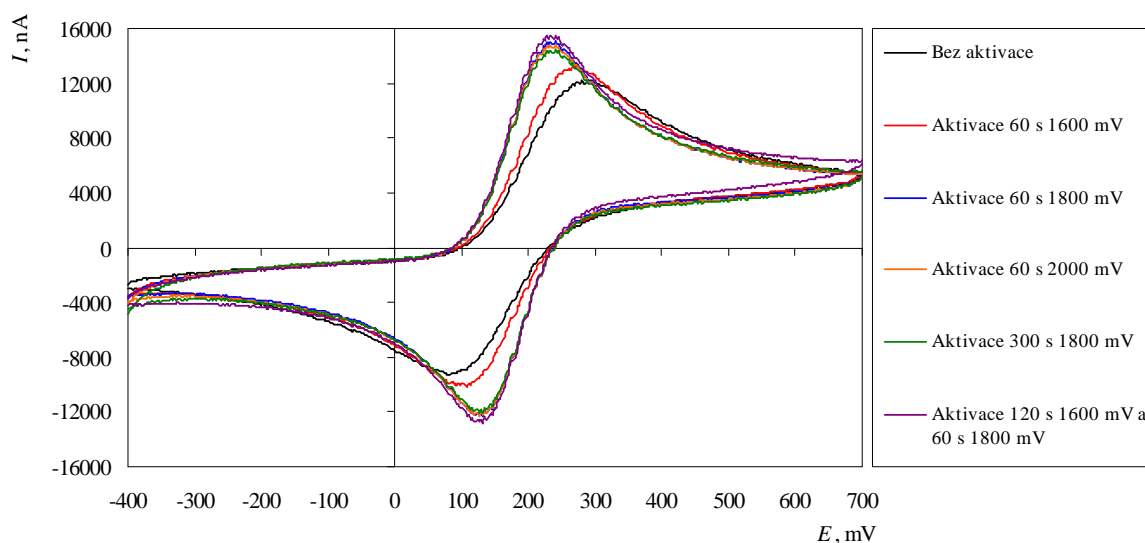
Měření pH připravených pufrů bylo prováděno pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou, nakalibrovaným pomocí standardních roztoků pufrů.

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Předúprava pracovní elektrody

SPCE byla elektrochemicky aktivována aplikováním potenciálu +1600 mV po dobu 120 s a +1800 mV po dobu 60 s v 10 ml acetátového pufru. Tento krok byl nutný ke zoxidování všech kontaminantů nacházejících se na pracovní elektrodě a k aktivaci elektrodového povrchu. Aktivací se zlepšuje citlivost a reprodukovatelnost měření.

Po každé aktivaci následovalo změření cyklických voltamogramů $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl pro kontrolu stavu povrchu pracovní elektrody, viz. obr. 4.



Obr. 4: Cyklické voltamogramy $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl. Měřeno na SPCE.

2.3.2 Voltametrická měření

Pokud není uvedeno jinak, pro měření voltametrických křivek byly měřené roztoky připraveny tak, že do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno odpovídající množství zásobního roztoku NF a doplněno po rysku BR pufrem o příslušném pH nebo $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátovým pufrem o pH 4,6. Takto připravené roztoky byly promíchány a převedeny do voltametrické nádoby. Následně byl roztok zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Pokud není uvedeno jinak, byl roztok před každým měřením promíchán automatickým míchátkem po dobu 30 s a následně nechán ustálit po dobu 15 s. Poté byl proveden záznam voltametrické křivky. S výjimkou dvacetinásobného měření nejvyšší koncentrace NF při zjišťování opakovatelnosti stanovení a desetinasobného

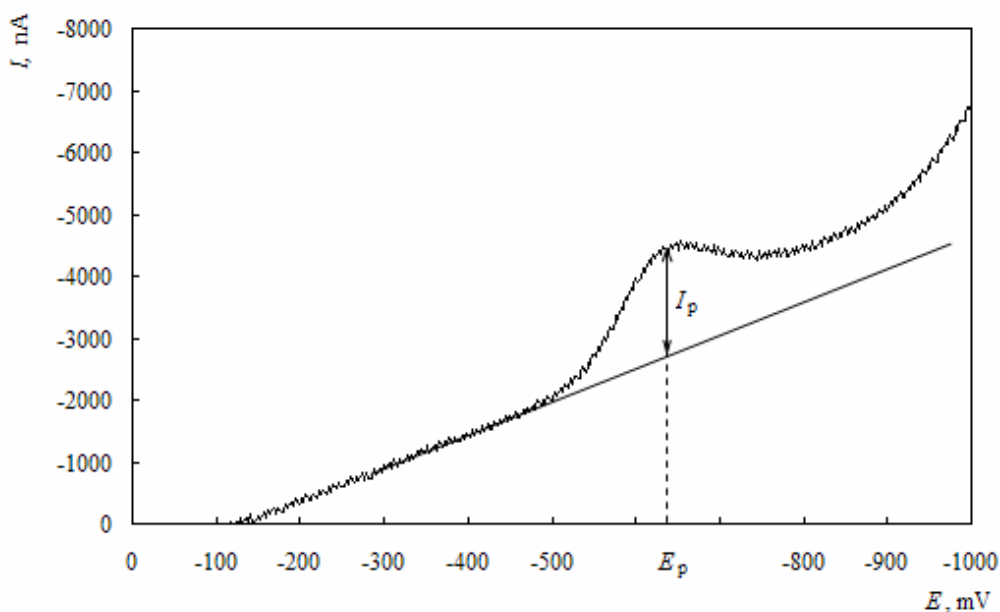
měření nejnižší měřitelné koncentrace NF danou technikou byly všechny křivky měřeny pětkrát. Veškerá měření byla prováděna za laboratorní teploty.

Získané voltamogramy byly vyhodnocovány způsobem zobrazeným na obr. 5 (pro DCV) a obr. 6 (pro DPV). Vyhodnocením křivek byly získány hodnoty potenciálu píku (E_p) a proudu píku (I_p).

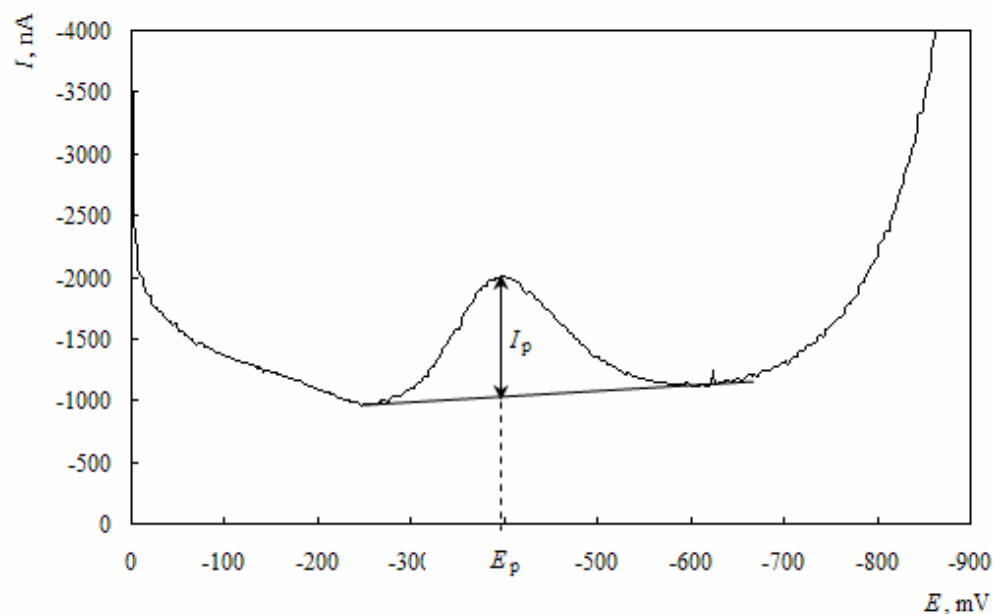
2.3.3 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat

K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programů OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA).

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti voltametrických měření na SPCE bylo provedeno dle zavedených chemometrických norem pro tento typ souboru dat. Mez stanovitelnosti (L_Q) byla vypočtena jako koncentrace odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky deseti měření sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky.



Obr. 5: Způsob vyhodnocování DC voltamogramů při stanovení 2-nitrofluorenu. DC voltamogram 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$); měřeno na SPCE v prostředí methanol - BR pufr o pH 5,0 (1: 99); I_p - proud píku, E_p - potenciál píku.



Obr. 6: Způsob vyhodnocování DP voltamogramů při stanovení 2-nitrofluorenu. DP voltamogram 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$); měřeno na SPCE v prostředí methanol - BR pufr o pH 2,0 (1:99); I_p - proud píku, E_p - potenciál píku.

2.3.4 Stabilita zásobního roztoku 2-nitrofluorenu

Stabilita zásobního roztoku NF o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu byla již dříve sledována spektrofotometricky, např. v práci⁴¹.

Z výsledků výše uvedené práce⁴¹ vyplývá, že v průběhu 33 dnů nedošlo v zásobním roztoku NF uchovávaném ve tmě za laboratorní teploty k významnému poklesu koncentrace studované látky, a je tedy možno jej za těchto podmínek považovat za stálý.

3. Voltametrické stanovení 2-nitrofluorenu na SPCE

3.1 DC voltametrie

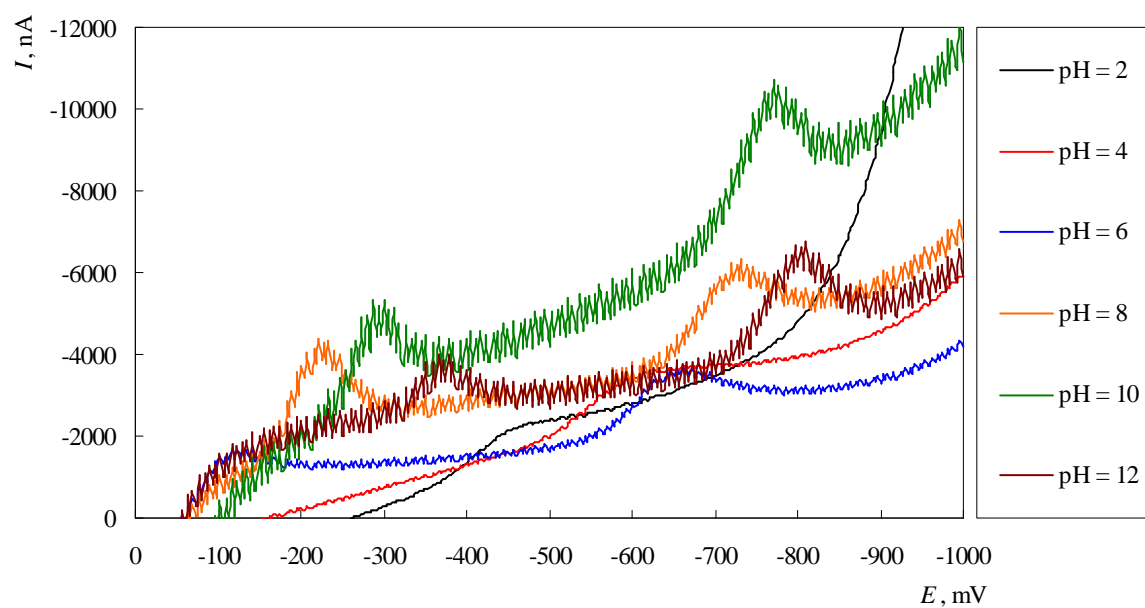
Závislost voltametrického chování NF na pH při DCV stanovení byla zkoumána za použití pufovaných vodně-methanolických roztoků obsahujících methanol a BR pufr o daném pH v objemovém poměru 1:99, v rozsahu pH použitého BR pufru 2,0 až 12,0. Koncentrace NF v těchto roztocích činila $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (vyšší obsah methanolu, který by dovoľoval stanovit NF ve vyšší koncentraci, nebylo možné použít, protože se zvyšujícím se obsahem methanolu ve studovaných vzorcích se úměrně zvyšovala i hodnota šumu; využití SPCE používaných v této práci se proto nejeví pro prostředí s obsahem methanolu větším než 5 % jako vhodné). V této koncentraci byl NF ještě dostatečně rozpustný. Odpovídající hodnoty I_p a E_p pro daná pH jsou uvedeny v tab. 6.

Tab. 6: Vliv pH na DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), měřeno na SPCE v prostředí methanol - BR pufr (1:99).

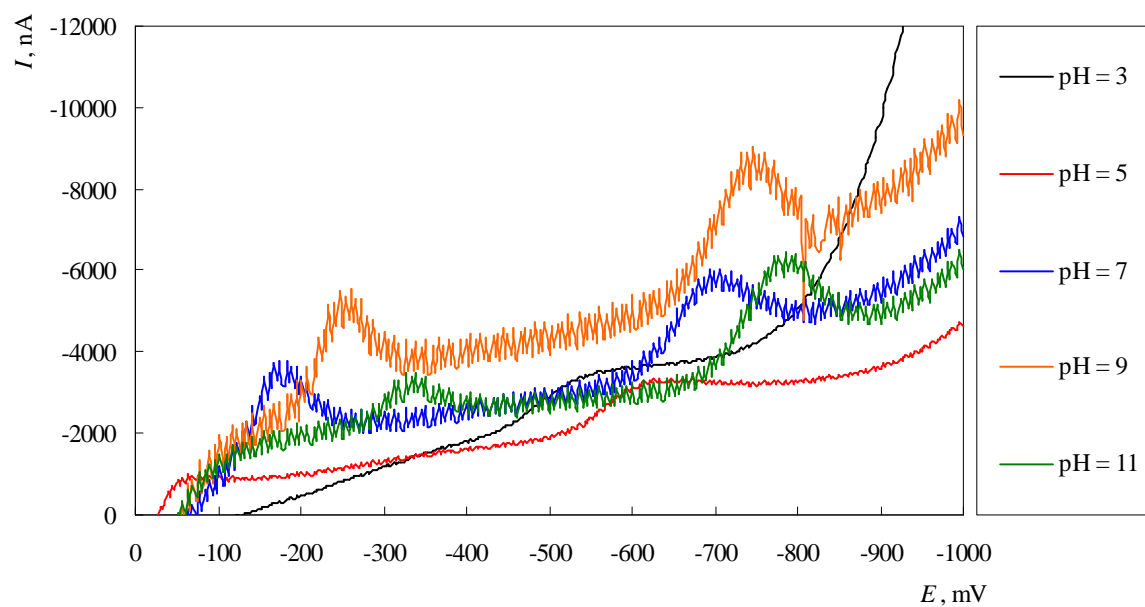
pH	$E_{p,1}$ [mV]	$I_{p,1}$ [nA]	$E_{p,2}$ [mV]	$I_{p,2}$ [nA]
2,0	— ^a	— ^a	−457	−734,8
3,0	— ^a	— ^a	−551	−725,0
4,0	— ^a	— ^a	−623	−1028,6
5,0	— ^a	— ^a	−627	−1329,5
6,0	−126	−1565,0	−657	−1647,3
7,0	−177	−1461,5	−696	−1974,3
8,0	−222	−2149,3	−732	−2364,0
9,0	−252	−1565,0	−742	−2616,8
10,0	−297	−1536,3	−768	−2723,0
11,0	−337	−817,1	−791	−2879,0
12,0	−375	−937,0	−801	−2502,5

pH - pH použitého BR pufru; $E_{p,1}$ - potenciál prvního píku; $I_{p,1}$ - proud prvního píku;
 $E_{p,2}$ - potenciál druhého píku; $I_{p,2}$ - proud druhého píku; —^a - pík nebyl pozorován

Zaznamenané voltametrické křivky jsou zobrazeny na obr. 8 a 9. Látka poskytuje jeden dobře vyvinutý voltametrický pík v celém rozsahu pH (tento pík je označován jako druhý, protože při pH 6,0 až 12,0 tomuto píku předchází menší pík, který je tedy označován jako pík první), jehož potenciál s rostoucím pH vykazuje monotónní pokles k negativnějším hodnotám. Proud píku směrem k vyšším hodnotám pH roste.



Obr. 8: DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), měřeno na SPCE v prostředí methanol - BR pufr (1:99); zobrazeny sudé hodnoty pH užitého BR pufru.



Obr. 9: DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), měřeno na SPCE v prostředí methanol - BR pufr (1:99); zobrazeny liché hodnoty pH užitého BR pufru.

Graficky je závislost potenciálu obou píků na výsledném pH roztoku znázorněna na obr. 10. Z něj je patrné, že závislost potenciálu píku vykazuje lineární charakter. Závislost potenciálu druhého píku lze rozdělit na dvě lineární závislosti, které na sebe zcela nenavazují. Tyto nespojitosti v linearitě indikují pravděpodobnou změnu přítomné formy NF či změnu redukčního mechanismu. Tento předpoklad potvrzuje pozorování prvního píku objevujícího se až v určité oblasti pH (6,0 až 12,0) Tento první pík pravděpodobně odpovídá reversibilní dvouelektronové redukci 2-nitrosofluorenu na 2-hydroxylaminofluoren; 2-nitrosofluoren může vznikat oxidací 2-hydroxylaminofluorenu (při pozitivnějších potenciálech vložených na SPCE na počátku každého voltametrického skenu) naakumulovaného na povrch SPCE z předchozího redukčního kroku (druhý pík). Tomuto jevu nasvědčuje i ten fakt, že při prvním měření na nové SPCE byl pozorován jen jeden voltametrický pík (druhý pík) a při dalších měřeních bylo možné pozorovat i pík při kladnějších potenciálech (první pík); obdobné voltametrické chování bylo popsáno i v literatuře⁹ při stanovení NF na p-AgSA-CE.

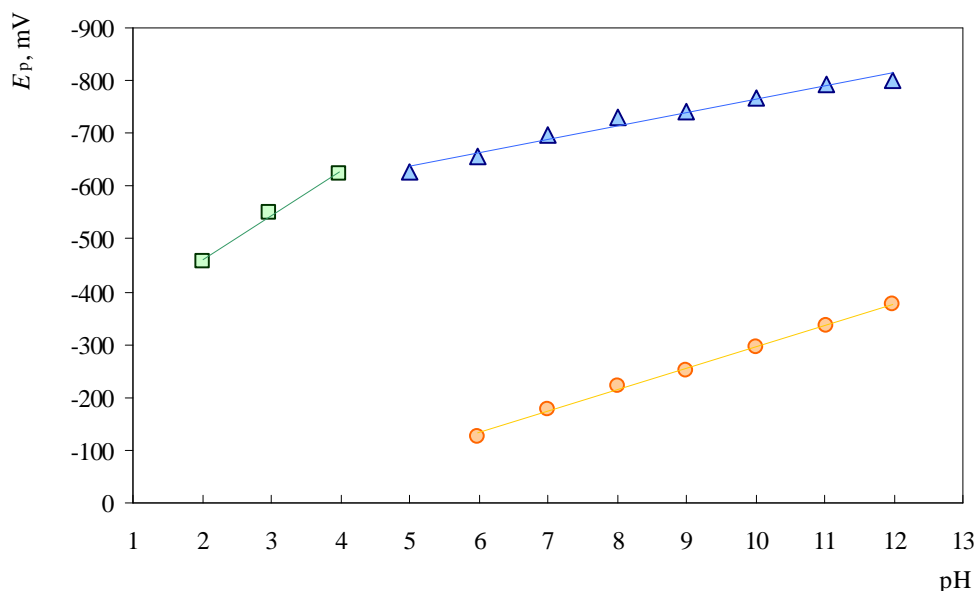
Získané lineární závislosti lze matematicky popsat pomocí následujících rovnic:

- pro potenciál prvního píku NF v rozmezí pH 6,0 až 12,0 platí:

$$E_{P,1} [\text{mV}] = -40,63\text{pH} + 110,8 \quad (R^2 = 0,9971)$$
- pro potenciál druhého píku NF v rozmezí pH 2,0 až 4,0 platí:

$$E_{P,2} [\text{mV}] = -84,09\text{pH} - 291,6 \quad (R^2 = 0,9925)$$
- pro potenciál druhého píku NF v rozmezí pH 5,0 až 12,0 platí:

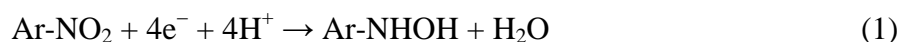
$$E_{P,2} [\text{mV}] = -25,16\text{pH} - 512,7 \quad (R^2 = 0,9726)$$



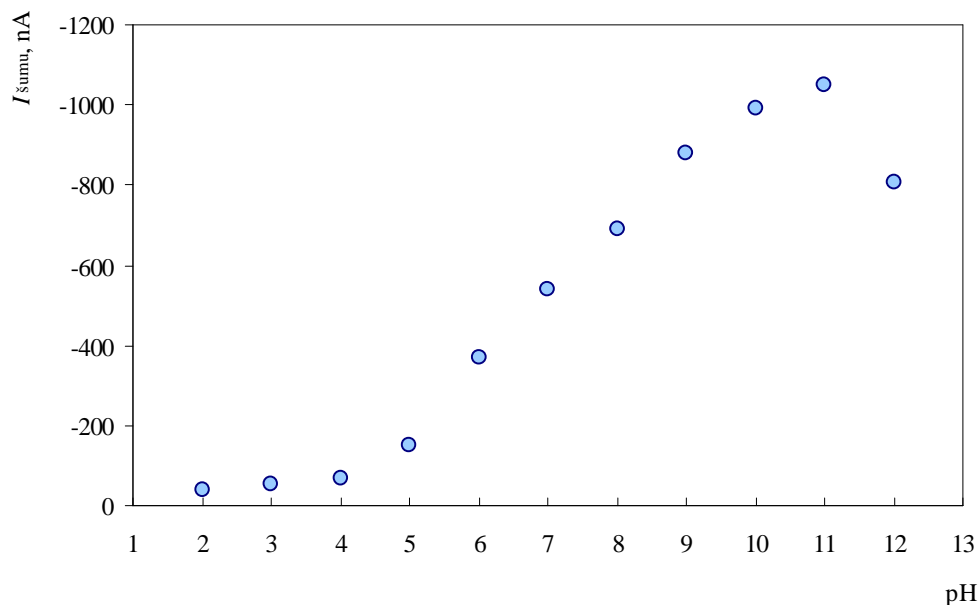
Obr. 10: Závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na výsledném pH roztoku. Měřeno technikou DCV na SPCE v roztoku methanol - BR pufr (1:99); zobrazeny závislost E_P prvního píku v rozmezí pH 6,0 až 12,0 (1), druhého píku v rozmezí pH 2,0 až 4,0 (2) a druhého píku v rozmezí 5,0 až 12,0 (3).

V kyselém prostředí, kdy je pozorován jen jeden voltametrický pík (druhý pík), se nitroskupina NF nachází v protonované formě. Redukce NF na 2-hydroxylaminofluoren probíhá snadno a se zvyšujícím se pH se potenciál druhého píku posouvá k negativnějším hodnotám (redukce NF je tím více obtížnější, čím menší je koncentrace vodíkových iontů v roztoku). Ke změně NF z protonované formy na neprotonovanou pravděpodobně dochází v rozmezí pH 4 až 6, při kterých dochází ke změně závislosti E_p na pH (obr. 10) a je také poprvé pozorován první pík, který je přítomen na voltamogramech až do pH 12,0.

V kyselém, neutrálním i alkalickém prostředí probíhá redukce NF na 2-hydroxylaminofluoren v jednom kroku (schéma 1; Ar reprezentuje arylový zbytek). Této redukci odpovídá voltametrický pík označovaný jako druhý.



Jako optimální bylo pro další měření zvoleno prostředí BR pufru o pH 5,0, které bylo pro zjednodušení nahrazeno prostředím 0,1 mol·l⁻¹ acetátového pufru o pH 4,6. Studovaná látka sice neposkytuje při tomto pH tak vysoké hodnoty proudu píku jako např. při pH 9,0, ale poskytuje pouze jeden dobře vyvinutý voltametrický pík a zároveň není pozorován tak vysoký šum (hodnota šumu úměrně rostla se zvyšující se hodnotou pH elektrolytu, viz. obr. 11, kromě pH 12,0, kdy hodnota šumu oproti očekávání opět klesla).

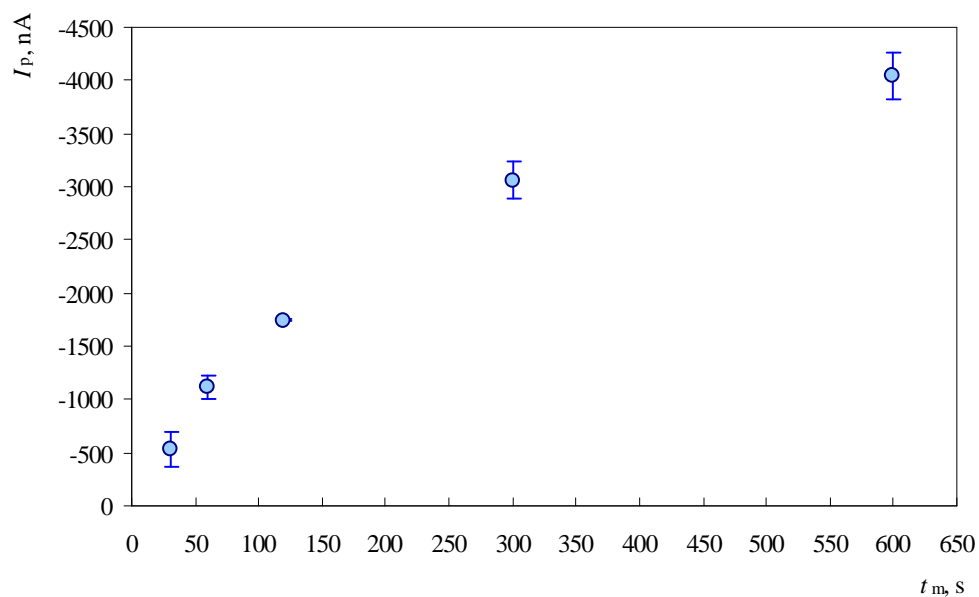


Obr. 11: Závislost velikosti šumu na výsledném pH roztoku. Měřeno technikou DCV na SPCE v roztoku methanol - BR pufr (1:99).

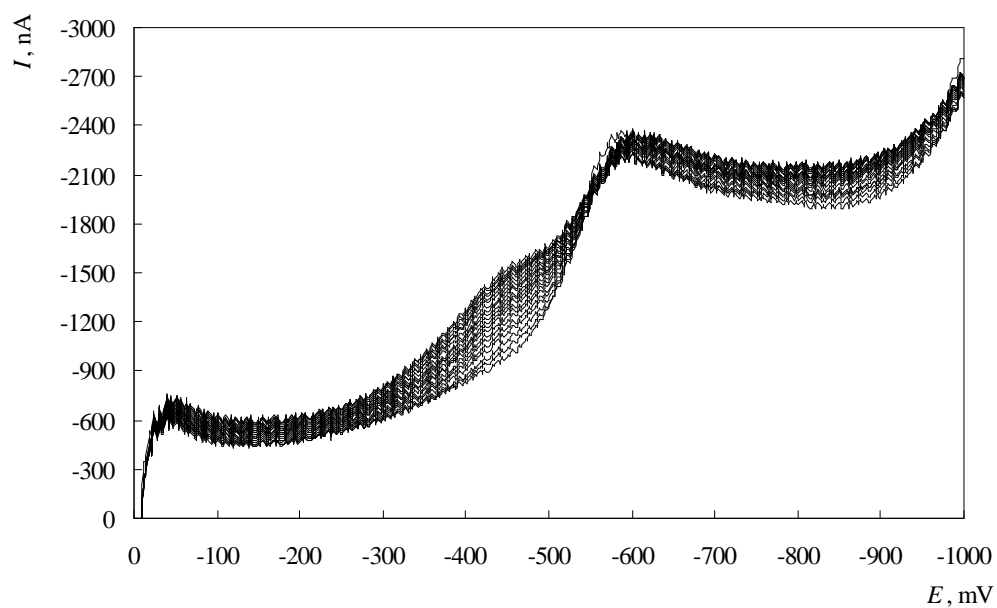
Při další optimalizaci podmínek pro stanovení NF byl studován vliv doby míchání před vlastním stanovením (u SPCE je běžným jevem samovolná akumulace analytu na povrch pracovní elektrody³⁷) na výšku píku NF a opakovatelnost stanovení NF (měřeno na nové SPCE). Jako optimální doba míchání roztoku (t_m) byla zvolena doba 120 s. Při tomto časovém úseku míchání vzorku bylo zjištěno, že následně měřené píky vykazují nejlepší opakovatelnost a uspokojivou výšku (obr. 13); delší doba míchání s sebou sice přinášela vyšší píky NF, ale také horší opakovatelnost stanovení a přílišné prodloužení celkového času pěti po sobě jdoucích měření. Vlivem zhoršování kvality elektrodového povrchu opakovaným měřením (vlivem pasivace elektrodového povrchu produkty elektrodové reakce) se v průběhu na sebe navazujících 20 měření začal postupně vyvíjet další pík předcházející druhému píku (obr. 13), který však neměl žádný vliv na vyhodnocování signálu druhého píku. Na obr. 15 je ukázáno, jakým způsobem bylo provedeno vyhodnocení měření opakovatelnosti stanovení NF.

Při voltametrickém stanovení NF v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ acetátového pufru o pH 4,6 dosáhla opakovatelnost měření vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou po vyřazení prvního měření (soubor dat testován na odlehlost Deanovým-Dixonovým testem) hodnoty 0,39 % ($n = 19$) (obr. 13 a obr. 14).

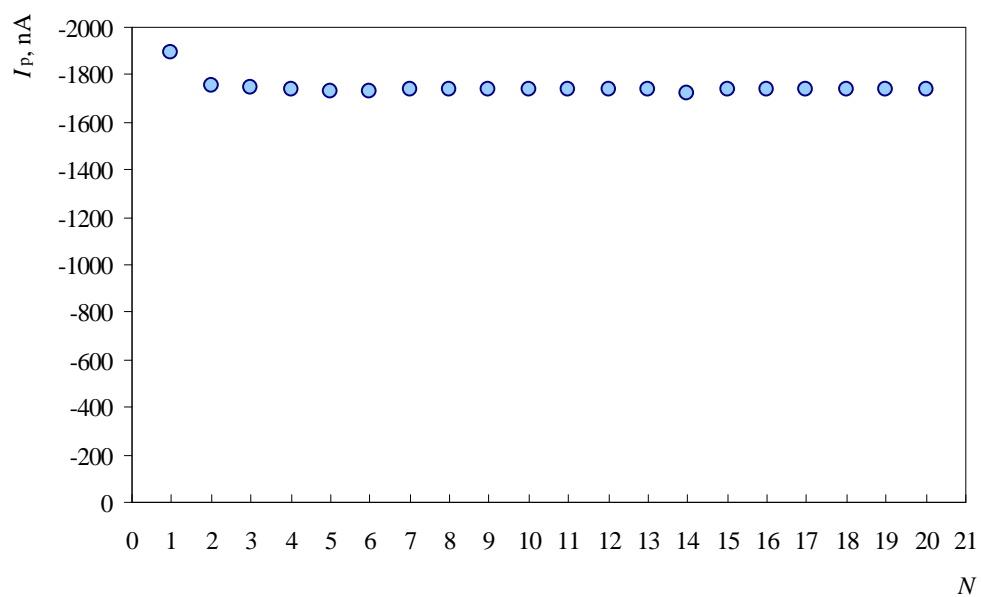
Koncentrační závislosti byly ve zvoleném prostředí měřeny v rozmezí $1\cdot 10^{-6}$ až $1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na nové SPCE (obr. 16). Nižší koncentrace než $1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pak již nebylo možné vyhodnotit. Tuto koncentraci je tedy možno za daných podmínek považovat za nejnižší vyhodnotitelnou koncentraci. Odpovídající závislosti proudu píku na koncentraci NF jsou uvedeny na obr. 17. Se zhoršující se kvalitou elektrodového povrchu po každém měření NF se redukce NF uskutečňovala ve dvou krocích. Nejprve se pravděpodobně redukoval NF naadsorbovaný v tenké vrstvě povrchu elektrody a poté NF přítomný v difúzní vrstvě elektrody. Jiná poloha na povrchu elektrody mohla mít za následek jiný potenciál redukce. Tento předpoklad lze pozorovat také na křivkách ZE, které po expozici elektrody NF vykazovaly i po důkladném oplachu elektrodového povrchu destilovanou vodou odezvu zbytkového NF. Právě tento zbytkový signál nejspíše způsoboval zvýšený úsek kalibrační přímky (obr. 17) a také znemožňoval stanovení látky při nižších koncentracích, protože zabraňoval spolehlivému vyhodnocení křivek. Po každém dalším přidavku analytu se zvedalo pozadí (lze pozorovat na obr. 16). Při koncentraci $1\cdot 10^{-5}$ na obr. 16 nabývá proud píku hodnoty -3014 nA, přičemž pro stejnou koncentraci na obr. 13 se pohybuje kolem -1750 nA, což znamená navýšení hodnoty proudu píku o 1264 nA. Úsek kalibrační přímky této hodnotě přibližně odpovídá.



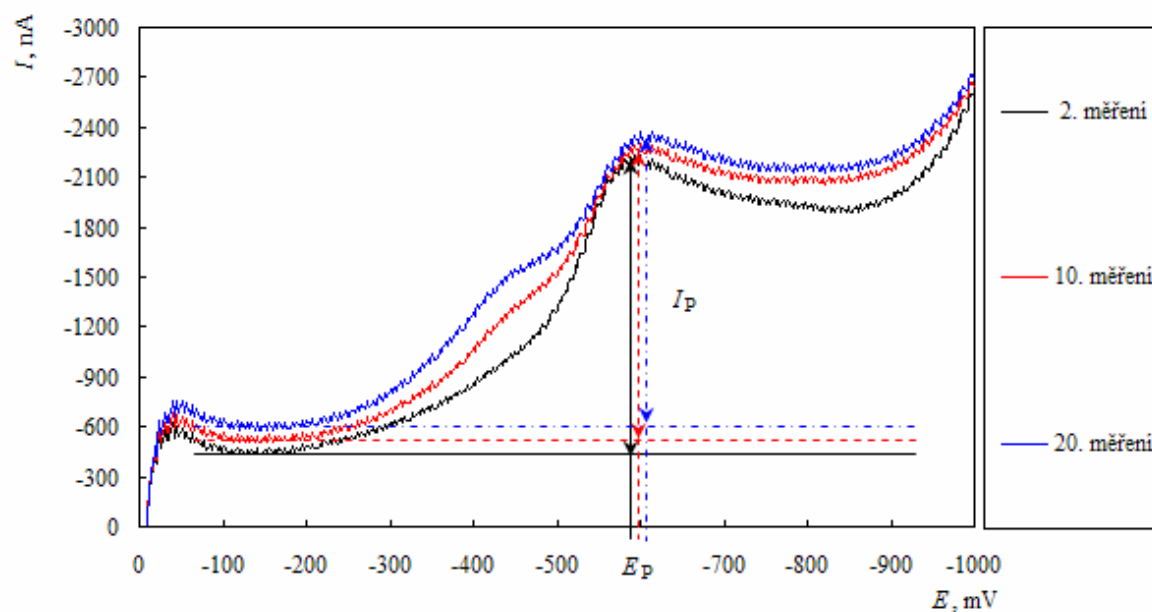
Obr. 12: Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na čase míchání před vlastním stanovením (t_m). Měřeno technikou DCV na SPCE v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátového pufru o pH 4,6.



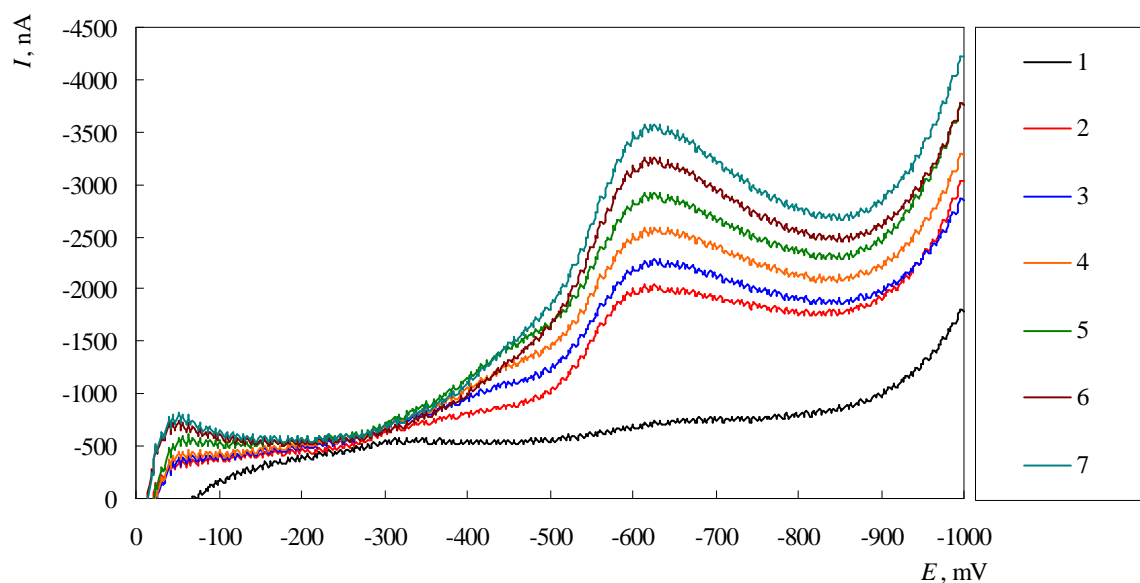
Obr. 13: DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na SPCE v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátového pufru o pH 4,6; $t_m = 120 \text{ s}$. Měřeno bez aplikace regeneračních potenciálů ($n = 20$).



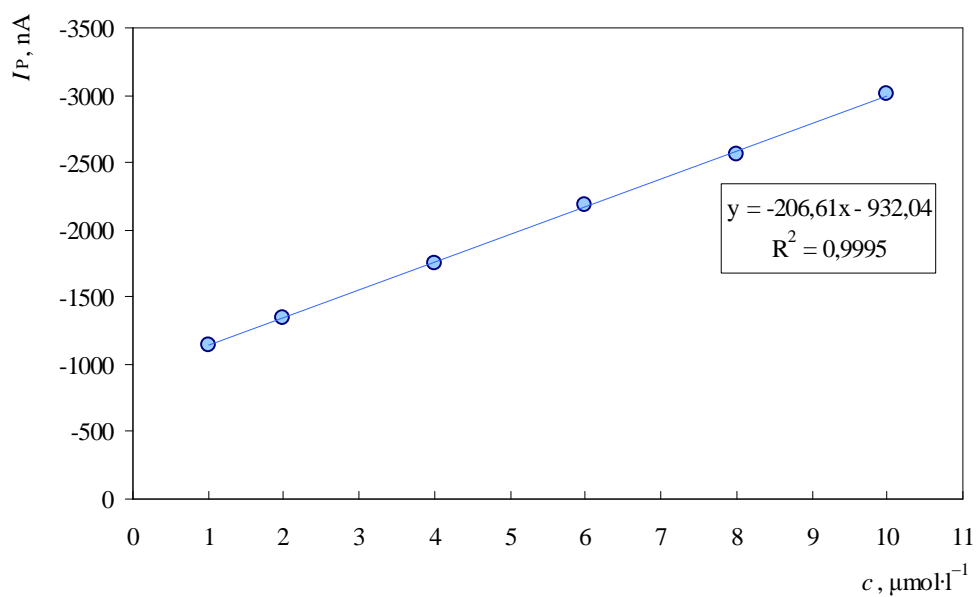
Obr. 14: Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pořadovém čísle měření (N) bez aplikace regeneračních potenciálů. Měřeno technikou DCV na SPCE v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátového pufru o pH 4,6; $t_m = 120 \text{ s}$ ($n = 20$).



Obr. 15: Ukázka vyhodnocení DC voltamogramů 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Měřeno na SPCE v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátového pufru o pH 4,6 bez aplikace regeneračních potenciálů ($n = 20$); $t_m = 120 \text{ s}$.



Obr. 16: DC voltamogramy 2-nitrofluorenu na SPCE v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Koncentrace 2-nitrofluorenu ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$): ZE (1), $1 \cdot 10^{-6}$ (2), $2 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $6 \cdot 10^{-6}$ (5), $8 \cdot 10^{-6}$ (6), $1 \cdot 10^{-5}$ (7). Měřeno v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku acetátového pufru o pH 4,6; $t_m = 120 \text{ s}$.



Obr. 17: Závislost proudu píku na koncentraci 2-nitrofluorenu v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na SPCE v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku acetátového pufru o pH 4,6; $t_m = 120 \text{ s}$.

Charakteristiky kalibračních přímek stanovení NF v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku acetátového pufru o pH 4,6 shrnuje tabulka 7. V následující tabulce (tab. 8) je vyhodnocena opakovatelnost měření nejvyšší a nejnižší měřené koncentrace NF bez aplikace regeneračních potenciálů.

Tab. 7: Charakteristiky kalibrační přímky stanovení 2-nitrofluorenu technikou DCV na SPCE v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku acetátového pufru o pH 4,6.

$c [\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}]$	směrnice $[\text{nA}\cdot\text{l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}]$	úsek $[\text{nA}]$	R^2	$L_Q [\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}]$
$(1-10)\cdot 10^{-6}$	-206,61	-932,04	0,9995	$0,85\cdot 10^{-5}$

Tab. 8: Statistické vyhodnocení opakovatelnosti stanovení 2-nitrofluorenu metodou DCV na SPCE pro koncentraci $1\cdot 10^{-5}$ a $1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku acetátového pufru o pH 4,6, počet měření $n = 10$ (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$).

$c [\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}]$	$\bar{x} [\text{nA}]$	$L_{1,2} [\text{nA}]$	$s [\text{nA}]$	$s_r [\%]$
$1\cdot 10^{-5}$	-3002,0	6,29	7,18	-0,24
$1\cdot 10^{-6}$	-1096,6	10,84	17,49	-1,59

3.2 Diferenční pulsní voltametrie

Závislost voltametrického chování NF na pH byla zkoumána také pomocí techniky DPV. Vliv pH byl zkoumán a vyhodnocován obdobně, jako při technice DCV (kapitola 3.1). Škála pH byla připravena za použití pufovaných vodně-methanolických roztoků obsahujících methanol a BR pufr o daném pH v objemovém poměru 1:99, v rozsahu pH použitého BR pufru 2,0 až 12,0. Hodnota koncentrace NF v těchto roztocích byla $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (vyšší obsah methanolu opět nebylo možné použít, protože se zvyšujícím se obsahem methanolu ve studovaných vzorcích se úměrně zvyšovala i hodnota šumu; využití SPCE používaných v této práci se tedy jeví pro prostředí s obsahem methanolu větším než 5 % jako nevhodné). Odpovídající hodnoty I_p a E_p pro daná pH jsou uvedeny v tab. 9.

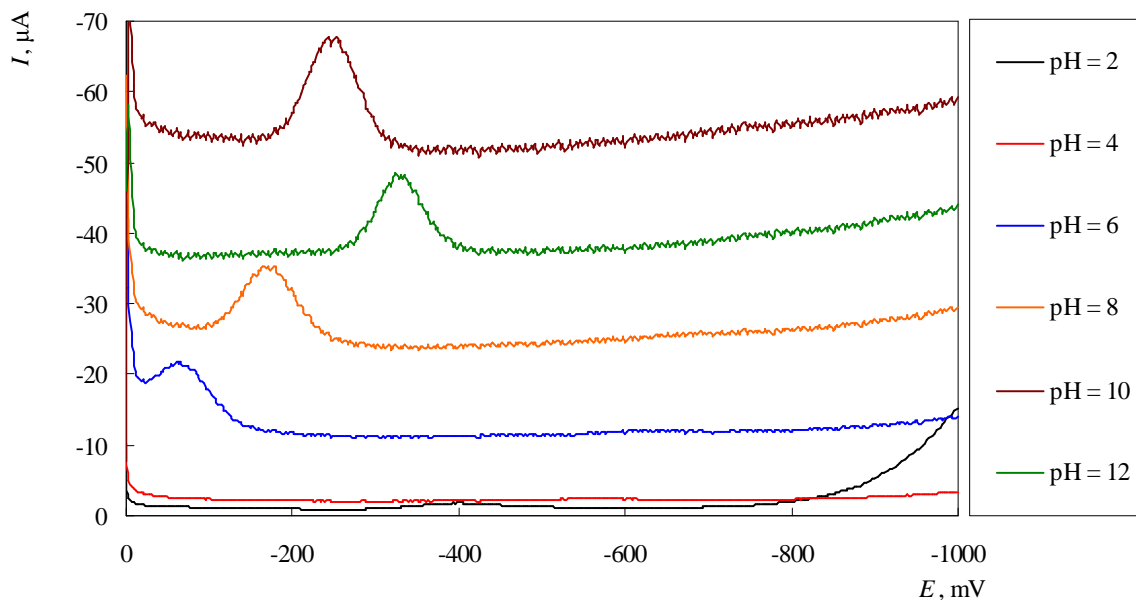
Tab. 9: Vliv pH na DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), měřeno na SPCE v prostředí methanol - BR pufr (1:99).

pH	$E_{p,1}$ [mV]	$I_{p,1}$ [nA]	$E_{p,2}$ [mV]	$I_{p,2}$ [nA]
2,0	— ^a	— ^a	−398	−807,8
3,0	— ^a	— ^a	−483	−204,0
4,0	— ^a	— ^a	−556	−244,7
5,0	— ^a	— ^a	−587	−307,9
6,0	−70	−4584,8	−630	−324,4
7,0	−122	−8482,2	−657	−264,7
8,0	−171	−10103,0	−687	−222,5
9,0	−207	−10609,4	— ^a	— ^a
10,0	−247	−11029,4	— ^a	— ^a
11,0	−285	−14008,0	— ^a	— ^a
12,0	−331	−11272,0	— ^a	— ^a

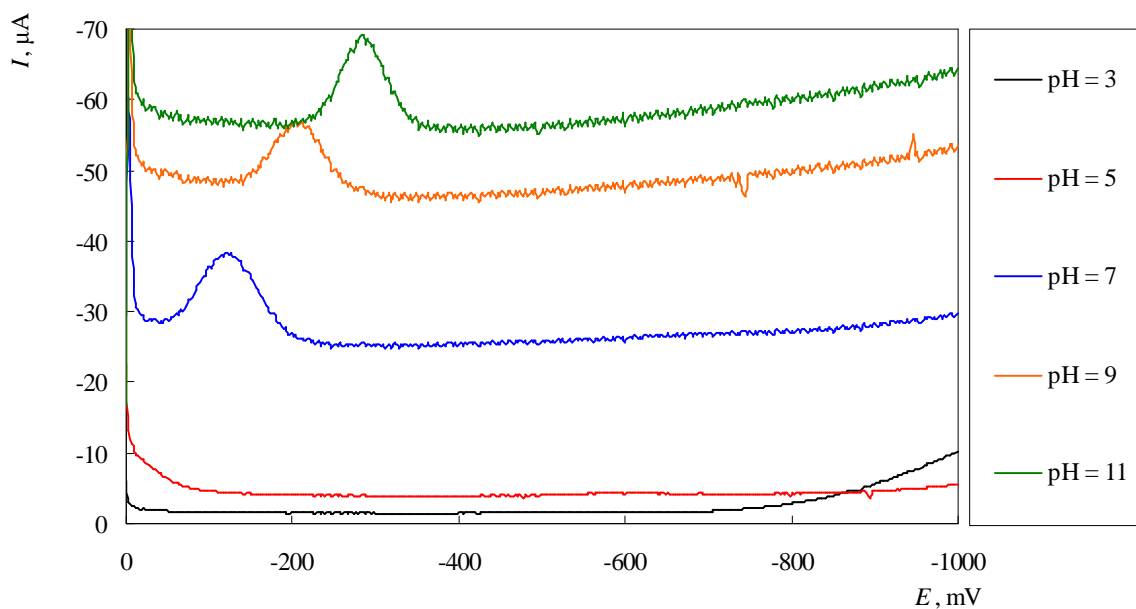
pH - pH použitého BR pufru; $E_{p,1}$ - potenciál prvního píku; $I_{p,1}$ - proud prvního píku; $E_{p,2}$ - potenciál druhého píku; $I_{p,2}$ - proud druhého píku; —^a - pík nebyl pozorován

Látka poskytuje dva dobře vyvinuté voltametrické píky. Jeden pík v rozsahu pH 6,0 až 12,0 (označován jako pík první) a druhý pík v rozsahu pH 2,0 až 8,0 (označován jako pík druhý). Zaznamenané voltametrické křivky jsou zobrazeny na obr. 18, 19 a 20. Na obr. 20 je zobrazen pouze druhý pík NF, který na obr. 18 a 19 ve stávajícím zobrazení vidět není kvůli velkému nárůstu pozadí a velikosti prvního píku, který zřejmě odpovídá produktu reversibilní dvouelektronové redukce 2-nitrosofluorenu na 2-hydroxylaminofluoren, naadsorbovanému na povrch SPCE z předchozího redukčního kroku (druhý pík). Na

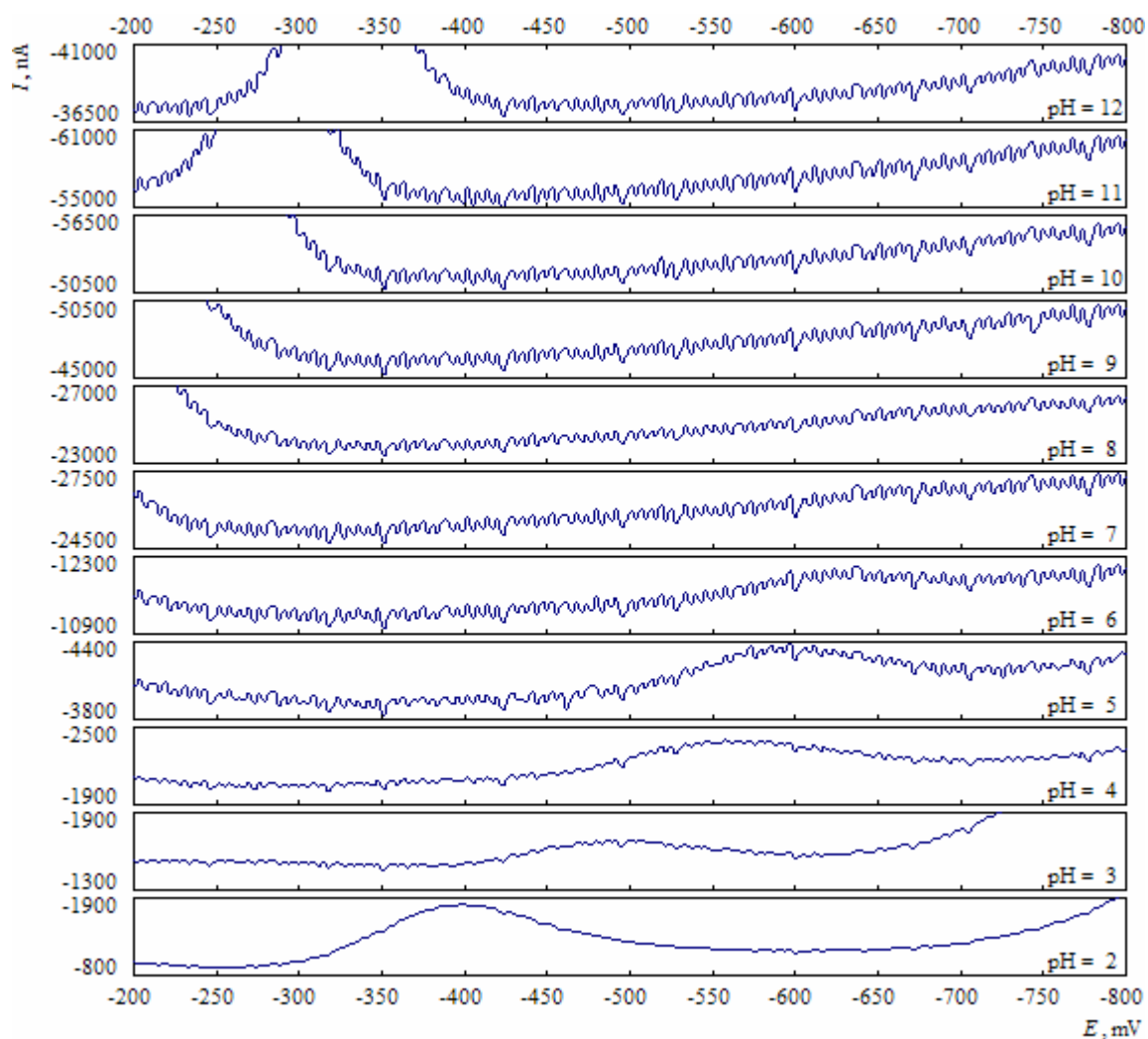
obr. 20 je též patrná zvyšující se hodnota výšky šumu v závislosti na hodnotě pH prostředí. Oba píky vykazují s rostoucím pH monotónní pokles potenciálu k negativnějším hodnotám, což ukazuje na závislost jednotlivých redukčních dějů, kterým příslušné píky odpovídají, na pH prostředí.



Obr. 18: DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), měřeno na SPCE v prostředí methanol - BR pufr (1:99); zobrazeny sudé hodnoty pH užitého BR pufru.



Obr. 19: DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), měřeno na SPCE v prostředí methanol - BR pufr (1:99); zobrazeny liché hodnoty pH užitého BR pufru.



Obr. 20: DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), měřeno na SPCE v prostředí methanol - BR pufr (1:99); zobrazen pouze druhý pík 2-nitrofluorenu při všech měřených hodnotách pH použitého BR pufru.

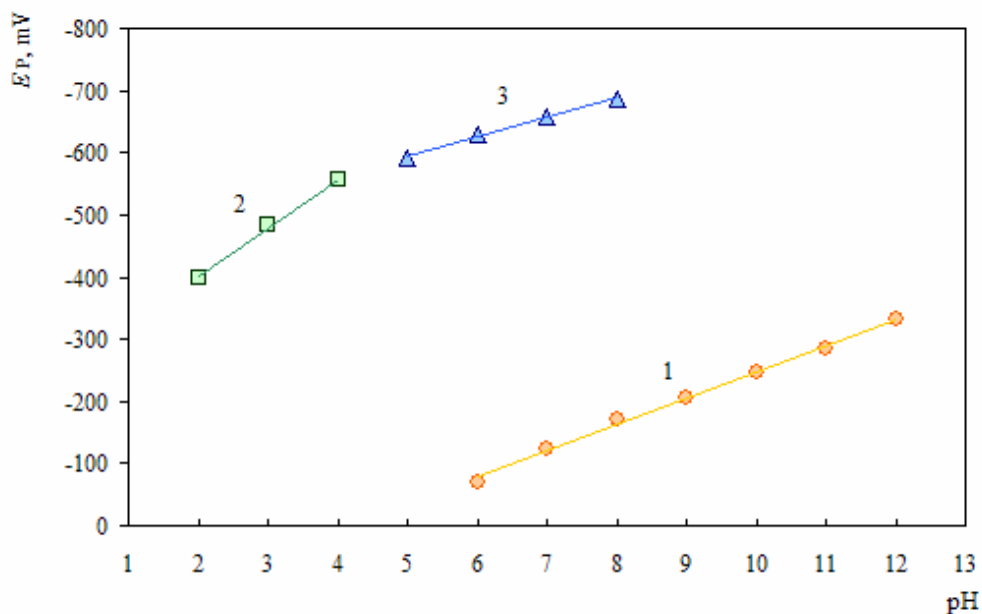
Graficky je závislost potenciálu obou píků na výsledném pH zobrazena na obr. 21, kde je patrný její lineární charakter. Závislost potenciálu druhého píku lze rozdělit na dvě lineární závislosti, které na sebe zcela nenavazují. (Stejně tak je tomu i při technice DCV, viz. kapitola 3.1, ve které již byly tyto nespojitosti včetně možného mechanismu elektrochemické redukce NF vysvětleny.) Metodou lineární regrese byly vypočteny následující vztahy:

- pro potenciál prvního píku NF v rozmezí pH 6,0 až 12,0 platí:

$$E_{P,1} [\text{mV}] = -42,31\text{pH} + 176,4 \quad (R^2 = 0,9966)$$
- pro potenciál druhého píku NF v rozmezí pH 2,0 až 4,0 platí:

$$E_{P,2} [\text{mV}] = -78,75\text{pH} - 243,0 \quad (R^2 = 0,9981)$$
- pro potenciál druhého píku NF v rozmezí pH 5,0 až 8,0 platí:

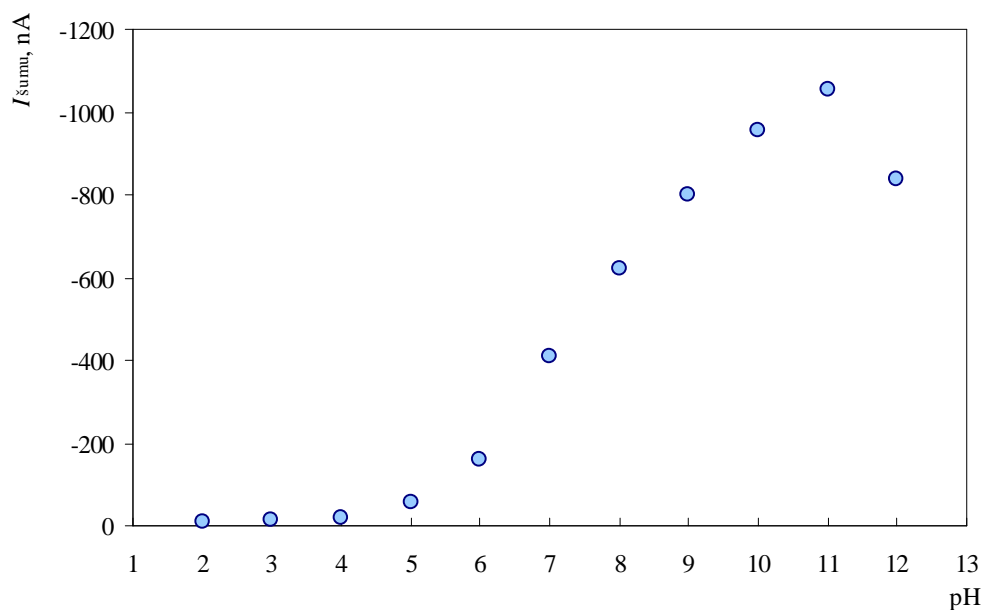
$$E_{P,2} [\text{mV}] = -31,13\text{pH} - 439,4 \quad (R^2 = 0,9934)$$



Obr. 21: Závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na výsledném pH roztoku. Měřeno technikou DPV na SPCE v roztoku methanol - BR pufr (1:99); zobrazeny závislost E_p prvního píku v rozmezí pH 6,0 až 12,0 (1), druhého píku v rozmezí pH 2,0 až 4,0 (2) a druhého píku v rozmezí 5,0 až 8,0 (3).

Hodnoty proudu druhého píku naměřené při pH 2,0 jsou vzhledem hodnotám proudu naměřeného při vyšším pH výrazně vyšší, stabilnější, je pozorován nejnižší šum, nejnižší proud pozadí. Studovaná látka zároveň poskytuje při tomto pH pouze jeden dobře vyvinutý voltametrický pík. Proto byla jako optimální prostředí pro další měření zvolena kyselá složka BR pufru o pH 2,0.

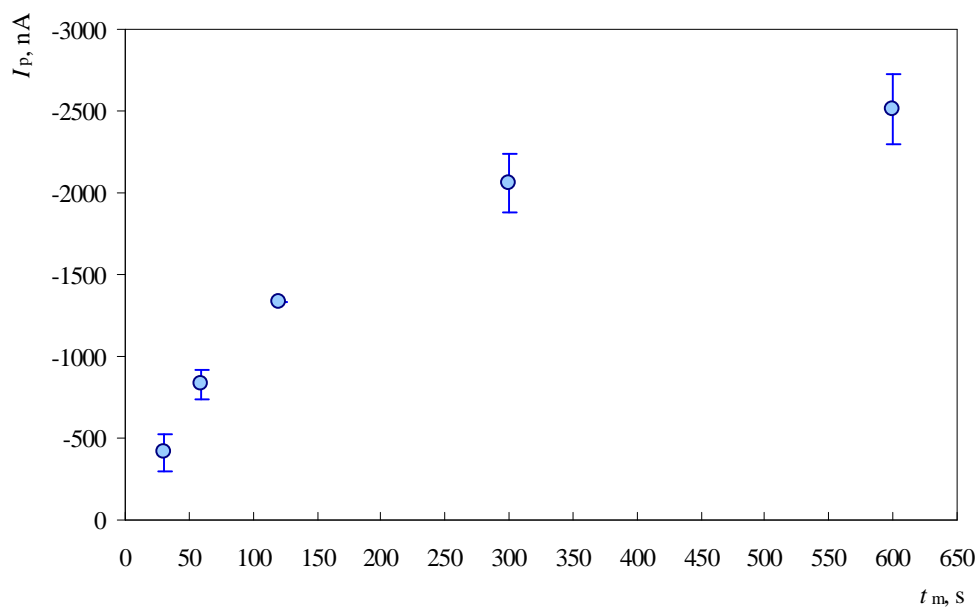
Voltametrické chování NF pozorované při technice DPV se liší od chování pozorovaného při technice DCV. Látka sice stejně jako při DCV poskytuje dva píky, avšak již při pH 9,0 je druhý pík tak malý a šum tak velký, že pík již nelze vyhodnotit. Hodnota šumu úměrně rostla se zvyšující se hodnotou pH, viz. obr. 21, kromě pH 12,0, kdy hodnota šumu oproti očekávání klesla. Naopak první pík nabývá hodnot přibližně desetkrát vyšších oproti DCV a vykazuje rostoucí charakter. Se zvyšujícím se pH se výrazně zvyšovalo pozadí. Závislost velikosti šumu na výsledném pH elektrolytu je zobrazena na obr. 20 a 22. Měření bylo prováděno bez užití regeneračních potenciálů stejně jako při technice DCV.



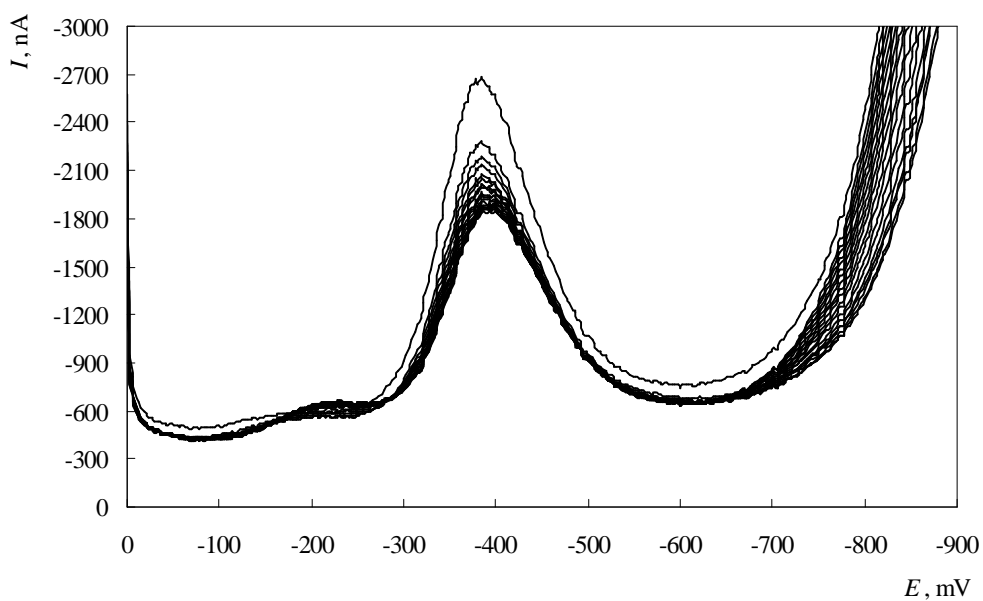
Obr. 22: Závislost velikosti šumu na výsledném pH roztoku. Měřeno technikou DPV na SPCE v roztoku methanol - BR pufr (1:99).

Při další optimalizaci podmínek pro stanovení NF byl studován vliv doby míchání před vlastním stanovením (u SPCE je běžným jevem samovolná akumulace analytu na povrch pracovní elektrody³⁷) na výšku píku NF a opakovatelnost stanovení NF (měřeno na nové SPCE). Jako optimální doba míchání roztoku (t_m) byla zvolena doba 120 s. Při tomto časovém úseku míchání vzorku bylo zjištěno, že následně měřené píky vykazují nejlepší opakovatelnost a uspokojivou výšku (obr. 23); delší doba míchání s sebou sice přinášela vyšší píky NF, ale také horší opakovatelnost stanovení a přílišné prodloužení celkového času pěti po sobě jdoucích měření. Vlivem zhoršování kvality elektrodového povrchu opakovaným měřením (vlivem pasivace elektrodového povrchu produkty elektrodové reakce) se v průběhu na sebe navazujících 20 měření začal postupně vyvíjet další pík předcházející druhému píku (obr. 24), který však neměl žádný vliv na vyhodnocování signálu druhého píku.

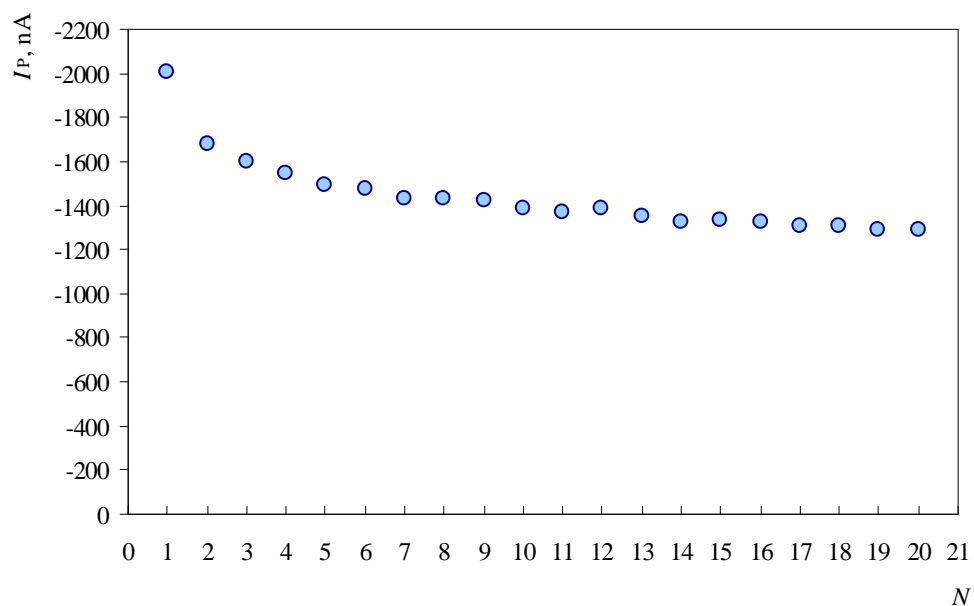
Při DPV stanovení NF v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 2,0 dosáhla opakovatelnost měření vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou po vyřazení prvních dvou měření (soubor dat testován na odlehlost Deanovým-Dixonovým testem) hodnoty 0,06 % ($n = 18$) (obr. 24 a obr. 25). Na obr. 26 je ukázáno, jakým způsobem bylo provedeno vyhodnocení měření opakovatelnosti stanovení NF.



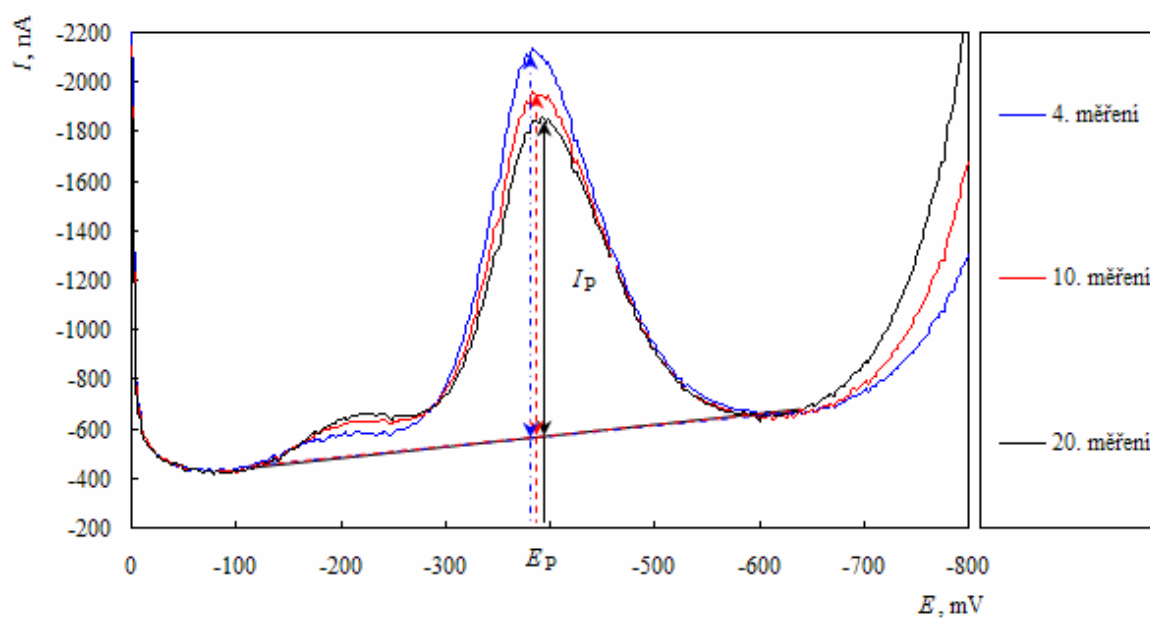
Obr. 23: Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na době míchání před vlastním stanovením (t_m). Měřeno technikou DPV na SPCE v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 2,0.



Obr. 24: DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na SPCE v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 2,0; $t_m = 120 \text{ s}$. Měřeno bez aplikace regeneračních potenciálů ($n = 20$).



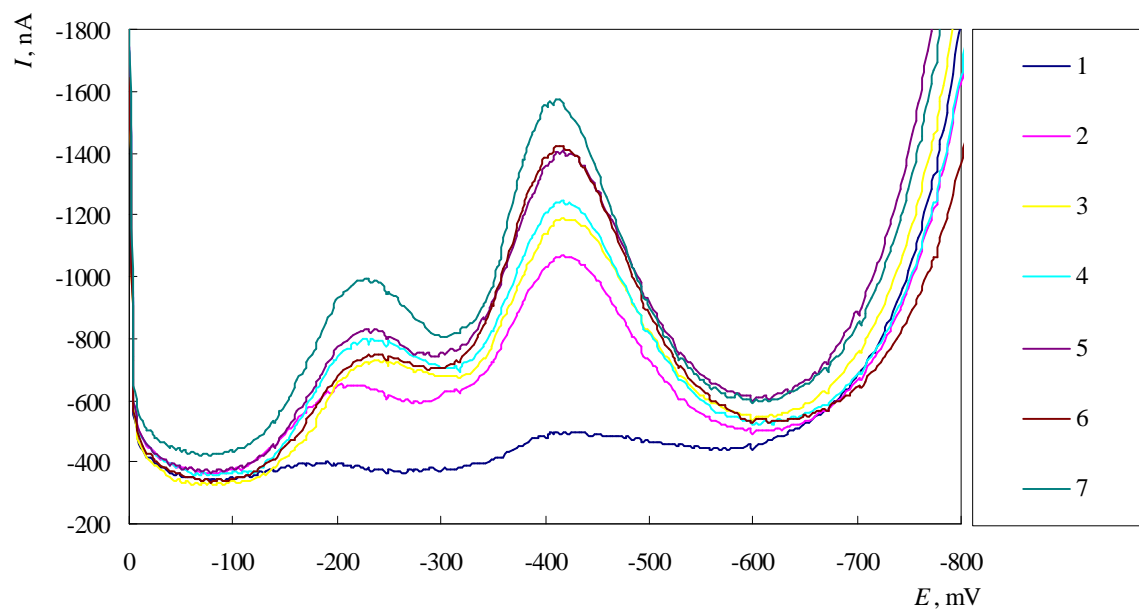
Obr. 25: Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pořadovém čísle měření (N) bez aplikace regeneračních potenciálů. Měřeno technikou DPV na SPCE v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 2,0; $t_m = 120 \text{ s}$ ($n = 20$).



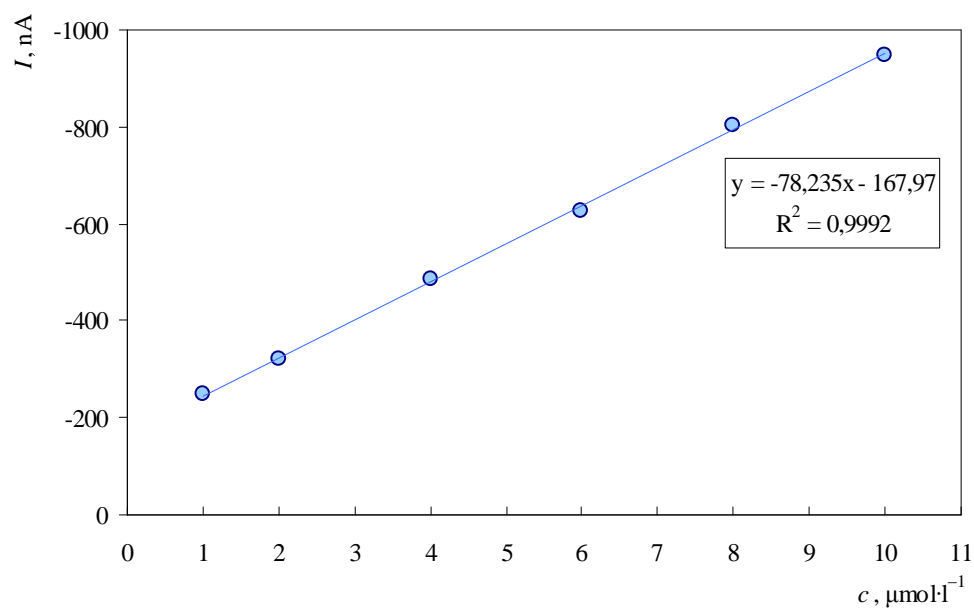
Obr. 26: Ukázka vyhodnocení DP voltamogramů 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Měřeno na SPCE v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 2,0 bez aplikace regeneračních potenciálů ($n = 20$); $t_m = 120 \text{ s}$.

Koncentrační závislosti byly ve zvoleném prostředí měřeny v rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na nové SPCE (obr. 27 a 29). Při měření koncentračních závislostí v rozmezí od $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla doba míchání 120 s a při měření rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ činila doba míchání 300 s kvůli dostatečné akumulaci látky na povrch elektrody. Nižší koncentrace než $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ studované látky nebylo možné vyhodnotit., proto lze tuto koncentraci za daných podmínek považovat za nejnižší vyhodnotitelnou.

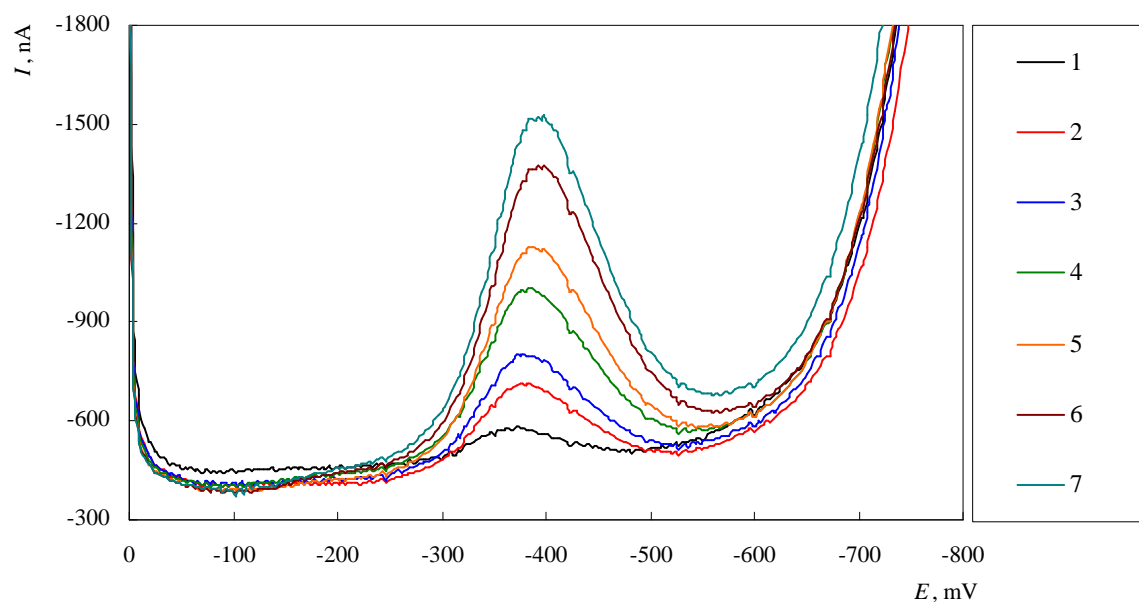
Odpovídající závislosti proudu píku na koncentraci NF jsou uvedeny na obr. 28 a 30. Se zhoršující se kvalitou elektrodového povrchu po každém měření NF se redukce NF uskutečňovala ve dvou krocích. Nejprve se pravděpodobně redukoval NF naadsorbovaný v tenké vrstvě povrchu elektrody a poté NF přítomný v difúzní vrstvě elektrody. Jiná poloha na povrchu elektrody mohla mít za následek jiný potenciál redukce. Tento předpoklad lze pozorovat také na křivkách ZE, které po expozici elektrody NF poskytovaly i po důkladném oplachu elektrodového povrchu odezvu zbytkového NF. Právě tento zbytkový signál zřejmě způsoboval zvýšený úsek kalibrační přímky (obr. 28 a 30) a také znemožňoval stanovení látky při nižších koncentracích, protože zabraňoval spolehlivému vyhodnocení křivek.



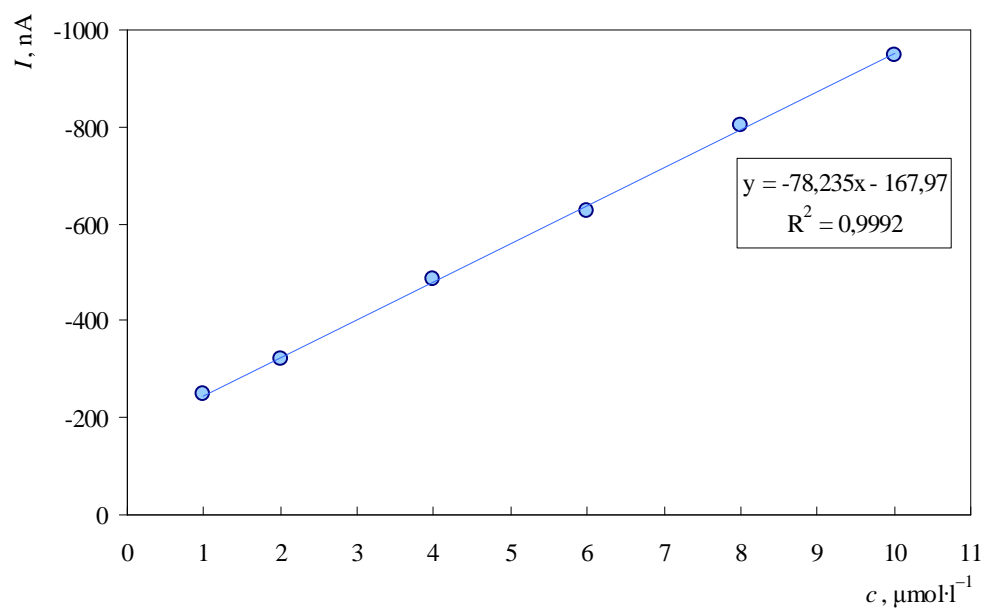
Obr. 27: DP voltamogramy 2-nitrofluorenu na SPCE v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Koncentrace 2-nitrofluorenu ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$): ZE (1), $1 \cdot 10^{-6}$ (2), $2 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $6 \cdot 10^{-6}$ (5), $8 \cdot 10^{-6}$ (6), $1 \cdot 10^{-5}$ (7). Měřeno v kyselé složce BR pufru o pH 2,0; $t_m = 120 \text{ s}$.



Obr. 28: Závislost proudu píku na koncentraci 2-nitrofluorenu v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na SPCE v v kyselé složce BR pufru o pH 2,0; $t_m = 120 \text{ s}$.



Obr. 29: DP voltamogramy 2-nitrofluorenu na SPCE v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Koncentrace 2-nitrofluorenu ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$): ZE (1), $1 \cdot 10^{-7}$ (2), $2 \cdot 10^{-7}$ (3), $4 \cdot 10^{-7}$ (4), $6 \cdot 10^{-7}$ (5), $8 \cdot 10^{-7}$ (6), $1 \cdot 10^{-6}$ (7). Měřeno v kyselé složce BR pufru o pH 2,0; $t_m = 300 \text{ s}$.



Obr. 30: Závislost proudu píku na koncentraci 2-nitrofluorenu v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na SPCE v v kyselé složce BR pufru o pH 2,0; $t_m = 300 \text{ s}$.

Charakteristiky kalibračních přímek stanovení NF v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 2,0 shrnuje tabulka 10. V následující tabulce (tab. 11) je vyhodnocena opakovatelnost měření nejvyšší a nejnižší měřené koncentrace NF bez použití regeneračních potenciálů.

Tab. 10: Charakteristiky kalibrační přímky stanovení 2-nitrofluorenu technikou DPV na SPCE v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 2,0.

c [mol·l ⁻¹]	směrnice [nA·l·μmol ⁻¹]	úsek [nA]	R^2	L_Q [mol·l ⁻¹]
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	-48,42	-569,25	0,9987	$0,62 \cdot 10^{-6}$
$(1-10) \cdot 10^{-7}$	-78,24	-167,97	0,9992	$2,01 \cdot 10^{-7}$

Tab. 11: Statistické vyhodnocení opakovatelnosti stanovení 2-nitrofluorenu metodou DPV na SPCE pro koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹ v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 2,0, počet měření $n = 10$ (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$).

c [mol·l ⁻¹]	\bar{x} [nA]	$L_{1,2}$ [nA]	s [nA]	s_r [%]
$1 \cdot 10^{-5}$	-1034,7	4,09	6,61	-0,64
$1 \cdot 10^{-7}$	-262,7	9,73	15,69	-5,97

4. Závěr

- 1) Bylo prozkoumáno chování 2-nitrofluorenu při DC voltametii na SPCE. Byly nalezeny optimální podmínky pro jeho stanovení v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Optimálním prostředím je $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátový pufr o pH 4,6, kdy 2-nitrofluoren poskytuje jeden vyvinutý voltametrický pík a hodnota šumu nedosahuje tak vysokých hodnot. Doba míchání stanovovaného vzorku byla zvolena 120 s. Dále byla určena mez stanovitelnosti, která činí $0,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
- 2) Bylo prozkoumáno chování 2-nitrofluorenu při diferenční pulsní voltametii na SPCE. Byly nalezeny optimální podmínky pro jeho stanovení v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Jako optimální bylo zvoleno prostředí kyselé složky BR pufru o pH 2,0, kdy 2-nitrofluoren poskytuje pouze jeden dobře vykreslený pík poskytující nejvyšší proudovou odezvu a zároveň vykazující nejnižší hodnoty šumu a pozadí. Doba míchání stanovovaného vzorku byla zvolena 120 s pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a 300 s pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Dále byla určena mez stanovitelnosti $2,01 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, a pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla určena mez stanovitelnosti $0,62 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

5. Literatura

1. Kocourek, V.; Hajšlová, J. *Nitrované polycyklické uhlovodíky (nitroPAH): environmentální karcinogeny*; Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí: Praha, 2005.
2. Beije, B.; Möller, L. *Carcinogenesis* **1988**, 9, 1465-1470.
3. Yaffe, D.; Cohen, Y.; Arey, J.; Grosovsky, A. J. *Risk Analysis* **2001**, 21, 275-294.
4. Vyskočil, V.; Navrátil, T.; Polášková, P.; Barek, J. *Electroanalysis* **2010**, 22, 2034-2042.
5. Möller, L.; Torndal, U.-B.; Eriksson, L. C.; Gustafsson, J.-A. *Carcinogenesis* **1989**, 10, 435-440.
6. Möller, L.; Zeisig, M.; Toftgard, R. *Carcinogenesis* **1993**, 14, 1723-1725.
7. Möller, L. *Environmental Health Perspectives* **1994**, 102, 139-146.
8. Möller, L.; Rafter, J.; Gustafsson, J.-A. *Carcinogenesis* **1987**, 8, 637-645.
9. Kinouchi, T.; Hideshi, T.; Ohnishi, Y. *Mutation Research* **1986**, 171, 105-113.
10. Möller, L.; Zeisig, M.; Midtvedt, T.; Gustafsson, J.-A. *Carcinogenesis* **1994**, 15, 857-861.
11. Vyskočil, V.; Barek, J. *Current Organic Chemistry* **2011**, 15, 3059-3076.
12. Vyskočil, V.; Navrátil, T.; Daňhel, A.; Dědík, J.; Krejčová, Z.; Škvorová, L.; Tvrdíková, J.; Barek, J. *Electroanalysis* **2011**, 23, 129-139.
13. Ueda, O.; S., K.; Ohashi, K.; Sugihara, K.; S., O. *Drug metabolism and disposition* **2003**, 31, 367-372.
14. Zielinska, B.; Samy, S. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 386, 883-890.
15. Břicháč, J.; Zima, J.; Barek, J. *Analytical Letters* **2004**, 37, 2379-2392.
16. Hirayama, K.; Baranczewski, P.; Akerlund, J. E.; Midtvedt, T.; Möller, L.; Rafter, J. *Carcinogenesis* **2000**, 21, 2105-2111.
17. Barek, J.; Cvačka, J.; Moreira, J. C.; Zima, J. *Chemické listy* **1996**, 90, 805-817.
18. Vyskočil, V.; Barek, J. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2009**, 39, 173-188.
19. Prchal, V.; Vyskočil, V.; Daňhel, A.; Barek, J.; Wang, J. *Chemické listy* **2011**, 105, 217-224.
20. Maccrehn, W. A.; May, W. E.; Yang, S. D.; Benner, B. A. *Analytical Chemistry* **1988**, 60, 194-199.
21. Barek, J.; Pumera, M.; Muck, A.; Kadeřábková, M.; Zima, J. *Analytica Chimica Acta* **1999**, 393, 141-146.
22. Xu, J. H.; Lee, F. S. C. *Chemosphere* **2001**, 42, 245-250.
23. Armalis, S.; Novikova, N.; Kubiliene, E.; Zima, J.; Barek, J. *Analytical Letters* **2002**, 35, 1551-1559.

24. Pumera, M.; Muzikář, J.; Barek, J.; Jelínek, I. *Analytical Letters* **2001**, *34*, 1369-1375.
25. Pumera, M. *Diplomová práce*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 1997.
26. Hartung, A.; Kraft, J.; Schulze, J.; Kiess, H.; Lies, K. H. *Chromatografia* **1984**, *19*, 269-273.
27. Matsushita, H.; Iida, Y. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **1986**, *9*, 708-711.
28. Librando, V.; Fazzino, S. D. *Chemosphere* **1993**, *27*, 1649-1656.
29. Schulze, J.; Hartung, A.; Kiess, H.; Kraft, J.; Lies, K. H. *Chromatographia* **1984**, *19*, 391-397.
30. Rappaport, S. M.; Jin, Z. L.; Xu, X. B. *Journal of Chromatography* **1982**, *240*, 145-154.
31. Kalvoda, R.; Kopanica, M. *Pure and Applied Chemistry* **1989**, *61*, 97-112.
32. Barek, J.; Cvačka, J.; Muck, A.; Quaiserová, V.; Zima, J. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 799-803.
33. Vyskočil, V.; Daňhel, A.; Fischer, J.; Novotný, V.; Deýlová, D.; Musilová-Karaová, J.; Maixnerová, L.; Pecková, K.; Barek, J. *Chemické listy* **2010**, *104*, 1181-1195.
34. <http://www.nova-lab.cz/download/DRP-110.pdf>, staženo 22.1.2012.
35. Šebková, S. *Chemické listy* **2003**, *97*, 201-205.
36. Barek, J.; Fogg, A. G.; Muck, A.; Zima, J. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2001**, *31*, 291-309.
37. Renedo, O. D.; Alonso-Lomillo, M. A.; Martínez, M. J. A. *Talanta* **2007**, *73*, 202-219.
38. Morrin, A.; Killard, A. J.; Smyth, M. R. *Analytical Letters* **2003**, *36*, 2021-2039.
39. Fanjulbolado, P. *Electrochimica Acta* **2008**, *53*, 3635-3642.
40. Krejčí, J.; Prášek, J.; Fajcik, L.; Khatib, S.; Hejátková, E.; Jakubka, L.; Giannoudi, L. *Microelectronics International* **2004**, *21*, 20-24.
41. Krejčová, Z. *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2009.